

**Über die Einwirkung von OH-Radikalen auf
Laktatdehydrogenase in wässriger Lösung**

von

Hans Theodor Zahn

aus

Alesheim

1976 № 331



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546228_0071

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Einwirkung von OH-Radikalen auf Laktatdehydrogenase in wässriger Lösung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans Theodor Zahn
aus
Alesheim

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan:	Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent:	Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1976

meiner Frau CLAUDIA

gewidmet

INHALTSÜBERSICHT

Seite

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Problemstellung	2
2	EXPERIMENTELLER TEIL	5
2.1	Materialien und Geräte	5
2.1.1	Materialien	5
2.1.2	Geräte	6
2.2	Methoden	7
2.2.1	Vorbereiten des Enzympräparates	7
2.2.1.1	Allgemeines	7
2.2.1.2	Entsalzen der Enzym-Kristall- Suspension	8
2.2.1.3	Herstellung des Puffers	10
2.2.2	Messung des Proteingehaltes	10
2.2.3	Bestrahlung	11
2.2.3.1	Bestrahlungsbedingungen	11
2.2.3.2	Dosisleistung	12
2.2.4	Messung der enzymatischen Aktivität	17
2.2.4.1	Prinzip	17
2.2.4.2	Durchführung	18
2.2.4.3	Auswertung	18

	Seite
2.2.5	Gelchromatographie 23
2.2.6	Aktivität im Chromatogramm 24
2.2.7	UV-Spektren 24
3	ERGEBNISSE 26
3.1	Verlust der enzymatischen Aktivität 26
3.1.1	Eichkurve für natives Enzym 26
3.1.2	Dosiseffektkurven unter N_2O und N_2 bei verschiedenen Enzymkonzentrationen 29
3.1.3	D_{37} bei verschiedenen Konzentrationen, G-Werte 36
3.2	Gelchromatographische Untersuchungen 43
3.3	UV-Spektren 52
3.4	Nachreaktionen 57
4	DISKUSSION 63
5	ZUSAMMENFASSUNG 76
6	LITERATURVERZEICHNIS 78

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Einleitung

Seit der Entdeckung der ionisierenden Strahlen und ihrer praktischen Anwendung haben sich der Medizin nicht nur neue Möglichkeiten, sondern auch eine Reihe von Problemen eröffnet, deren Tiefe und Vielfalt durch das Wachstum wissenschaftlicher Erkenntnis auf diesem Gebiet ständig im Zunehmen begriffen ist.

Mit dem Auftreten erster Strahlenerkrankungen wurde man aufmerksam auf eine spezifische Wirkung am und im Organismus zu dessen offensichtlichen Nachteil. So lag es nahe, sich genaueren Einblick in die Vorgänge zu verschaffen, die eindeutig nach Einwirkung von Strahlen zu krankhaften Veränderungen bis hin zu bösartigem Wachstum führten.

Dadurch sollte einerseits die Möglichkeit geschaffen werden, Einzelheiten über Pathogenese und Prognose von Strahlenkrankheiten zu erfahren, um deren Prophylaxe im Sinne des modernen Strahlenschutzes sowie deren Heilungsmöglichkeiten voranzutreiben. Andererseits versprach man sich vom Studium der Strahlenwirkung am Organismus die stete Verbesserung der Strahlentherapie, deren Bedeutung für die Bekämpfung maligner Geschwülste, meist verbunden mit operativen und chemotherapeutischen Maßnahmen, nach wie vor einen hohen Rang einnimmt.

Es hat sich nun gezeigt, daß die Analysen strahlenbiologischer Prozesse am Gesamtorganismus infolge der kompliziert miteinander verknüpften Regelmechanismen und der stofflichen Unterschiede der beteiligten Substanzen nicht zu der erwünschten Klarheit der Aussagen führt. Man suchte daher nach einfacheren Systemen, an denen man möglichst störungsfrei und damit genauer zu messen hoffte. Die Zelle, deren elementare Bedeutung für die belebte Natur lange erkannt war, erwies sich jedoch als ein nicht weniger kompliziertes Funktionsgefüge.

So führte der Weg zur Untersuchung von Zellbestandteilen, vorwiegend von Eiweißen, deren Funktionen in vitro meßbar waren. Diese Methode wurde entscheidend dadurch verbessert, daß der Proteinchemie die Reindarstellung von Eiweißstoffen aus organischem Material gelang. Damit verfügte die Strahlenbiologie endlich über geeignete Substanzen, an denen sich Veränderungen mit größerer Genauigkeit studieren lassen konnten (15).

1.2 Problemstellung

Zu den Proteinen, die dafür am besten geeignet sind, gehören die Enzyme, da sie zwei wesentlichen Kriterien genügen:

Einmal handelt es sich um Biokatalysatoren, die neben den Nukleinsäuren die wichtigsten Träger der Lebensfunktionen sind.

Zweitens lassen sich ihre katalytischen Wirkungen mit relativ einfachen Methoden in vitro gut messen, da die an den Reaktionen beteiligten Substanzen über besondere Eigenschaften verfügen (vgl. Abschnitt 2.2.4.1).

Die Reindarstellung verschiedener Enzyme, darunter auch Laktatdehydrogenase, deren Untersuchung vorliegende Arbeit dient, war um 1960 gelungen und führte zusammen mit der Entwicklung wichtiger eiweißanalytischer Methoden zu einer Reihe von Experimenten mit ionisierenden Strahlen an diesen Substanzen (15).

Man bediente sich dabei gewisser Vorstellungen über den molekularen Wirkungsmechanismus der Strahlen am Protein. So hatte Fricke (1) bereits 1927 eine "indirekte" Strahlenwirkung angenommen. Aus den Ergebnissen der Bestrahlung von oxygeniertem Hämoglobin zog er den Schluß, daß die primäre Wirkung der Strahlen in einer Reaktion mit dem Lösungswasser bestehen müsse, aus der eine bestimmte Anzahl strahlenmodifizierter Moleküle bzw. Teilchen hervorgegangen sein und sekundär mit dem Protein reagiert haben müsse.

Diese Annahme wurde später bestätigt und dahingehend erweitert, daß die aus dem Wasser gebildeten Produkte durch geeignete Messungen als Wasserradikale erkannt werden konnten (16 - 19). Die am Enzymmolekül beobachteten Veränderungen (Aktivitätsverlust, Aggregatbildung, Bruch von Bindungen und Abbau gewisser Aminosäurereste) mußten nun durch Wahl entsprechender Bedingungen als Wirkung jeweils einer Radikalsorte aufgeklärt werden.

Im Verlauf dieser Forschungen entstand eine Reihe von Arbeiten, die sich mit den genannten Vorgängen an verschiedensten Enzymen befassen. Es konnte bislang jedoch keine völlige Übereinstimmung darüber erzielt werden, auf welche Prozesse im einzelnen die gefundenen Ergebnisse zurückzuführen seien.

Zu den dieserart bestuntersuchten Enzymen gehören die Ribonuklease und die Laktatdehydrogenase. Ziel dieser Arbeit soll es sein, durch Bestrahlung einer mit Stickoxydul (N_2O) gesättigten Lösung von Laktatdehydrogenase folgende Fragen beantworten zu helfen:

1. Welchen Einfluß haben die unter diesen Bedingungen gebildeten OH-Radikale auf das Verhalten der enzymatischen Aktivität, der Absorption ultravioletten Lichtes und der Bildung verschieden großer Molekülformationen?
2. Wie verhalten sich die Effektivitäten der beteiligten Radikale bezüglich der Inaktivierung zueinander, einmal nach Bestrahlung unter N_2O sowie vergleichsweise unter N_2 ?

Da etliche Arbeiten vorliegen, die unter vergleichbaren Bedingungen an Ribonuklease und Laktatdehydrogenase vorgenommen worden sind, wird besonders auf Erfahrungen mit diesen Substanzen Bezug genommen werden.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Materialien

Für die Versuche wurden folgende Materialien verwendet:

- Laktatdehydrogenase ¹⁾, aus Kaninchenskelettmuskel in einer 3,2 M Ammonium-Kristallsuspension,
- Reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotid ²⁾ als di-Natriumsalz,
- Pyruvat als Mononatriumsalz; alle von Boehringer & Söhne, Mannheim,
- Sephadex G-25 fine und G-200,
- Blue Dextran 2000; beide von Pharmacia, Uppsala/Schweden,
- Marinon,
- Incidin als Konzentrat und Spray; beide von Henkel GmbH, Düsseldorf,
- Hibitane; Imperial Chemical Industries,
- Natriumazid,
- Neßler's Reagens, sowie alle übrigen Chemikalien von Merck, Darmstadt.

Zur Herstellung aller wässrigen Lösungen wurde ausschließlich entionisiertes und zweimal destilliertes Wasser verwendet, das im Institut über Ionenaustauscher und einer Quarzglasdestille entsprechend aufbereitet wurde.

Im folgenden werden nachstehend aufgeführte Abkürzungen verwendet:

- 1) LDH
- 2) NADH

2.1.2 Geräte

Bei der Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte benutzt:

- Therapie-Röntgenröhre TR 300 Stabilipan der Firma Siemens, Erlangen,
- Spektralphotometer PMQ von Carl Zeiss, Oberkochen,
- Quarz-Infrasil- und -suprasil-Küvetten (QI und QS) sowie Optisches Spezialglas-Küvetten (OS) von Hellma, Müllheim,
- Mikropipetten Marburg von Eppendorf Gerätebau, Hamburg,
- pH-Meter 27 von Radiometer, Kopenhagen/Dänemark,
- Elektrische Magnetrührgeräte JKA-Combimag von Janke und Kunkel, Staufen,
- Chromatographieröhre aus Plexiglas,
- Bestrahlungstopf aus Quarz mit Plexiglasmantel; beides nach Plan gefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Radiologie der Universität Erlangen-Nürnberg,
- Ultro Rac-Fraktionssammler LKB 7000 von LKB-Produkt, Bromma/Schweden,
- Colora Kühltruhe für Ultro Rac LKB 7000 von Colora Meßtechnik, Lorch/Württemberg,
- Optilab-Analog-Digital-Wandler Multilog 801,
- Optilab-Printer-Driver 833,
- Optilab-Präzisionstimer 825; alle von Optilab und Bo Philip, Instrumentation AB Vällingby/Schweden,
- Calculator 9100 von Hewlett Packard, Loveland, Colorado/U.S.A.,
- Kältethermostat Ultra Kryomet TK 30 von Wobser, Lauda.

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereiten des Enzympräparates

2.2.1.1 Allgemeines

Um eine möglichst hohe Meßgenauigkeit vor allem der Chromatographieläufe zu erzielen, mußten die Versuche unter keimarmen Bedingungen durchgeführt werden. Es zeigte sich, daß dies besonders während der Sommermonate von Bedeutung war, da das Wachstum von Mikroorganismen in dieser Zeit rascher und stärker vonstatten zu gehen schien als während des übrigen Jahres.

Aus diesen Gründen wurden alle Behältnisse, die mit dem Enzym, mit Pufferlösung oder Gel in Berührung kamen, vorher mit 70%igem Methanol, Propanol oder mit Marinon desinfiziert. Die Chromatographierohre wurden zunächst mit einem Laborreiniger wie Edisonite gesäubert, mit aqua dest. nachgespült, in Marinon oder Alkohol desinfiziert, mit sterilisiertem aqua dest. erneut gespült und bis zur Füllung im Kühlraum unter UV-Bestrahlung aufbewahrt. Das Gel und der Puffer, dessen Herstellung in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben wird, wurden vor Benutzung im Autoklaven 20 Minuten lang bei 120°C sterilisiert, was freundlicherweise von der Chirurgischen Klinik der Universität übernommen wurde. Die chromatographischen Versuche wurden über auf 4°C gekühlten Gelsäulen vorgenommen. Während der Benutzungspausen spülten wir Bakteriostatika in die Säulen ein und hobendiese in einem mit UV-Licht ausgeleuchteten, zusätzlich gekühlten Raum auf. Zur Bakterio-
stase verwendeten wir ein Gemisch aus Natriumazid

und Hibitane, dessen Komponenten namentlich im Sommer in der doppelten vom Hersteller angegebenen Konzentration enthalten waren. Eine Schädigung des Gels durch diese Maßnahme wurde nicht beobachtet. Von Zeit zu Zeit wurden Kühltruhe und Fraktions-sammler mit Incidinlösung gereinigt und vor jedem Chromatographielauf mit Incidinspray ausgesprüht. Die Kontrolle des Bakterienwachstums erfolgte mit Agarnährböden, die nach Beimpfung bis zu 48 Stunden bei 37°C bebrütet wurden.

2.2.1.2 Entsalzen der Enzymkristall-Suspension

Das Enzym wurde in 3,2 M Ammoniumsulfat (= 423 g/l) ausgefällt geliefert, wobei die Suspension nach Angaben des Herstellers 10 mg Enzym pro 1 ml Lösung enthielt. Da das Enzym in dieser Form für die Bestrahlung nicht verwendbar war, trennten wir das Salz chromatographisch mit Sephadex G-25 fine vom Protein ab. Das Dextrangel wurde dazu nach Angaben von Determann (5) vorbereitet und in das Plexiglasrohr eingefüllt. Das 49 · 1,4 cm große Gelbett wurde nach Prüfung auf Keimwachstum mit ca. 200 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer von pH 7,0 äquilibriert, 3 ml Enzymlösung mit 2 ml dieses Puffers verdünnt und die gleichmäßig in der Probe verteilte Suspension aufgetragen.

Die Elution erfolgte wieder mit 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0, der damit zugleich als Bestrahlungspuffer diente. Das Eluat ließ sich in 3 ml-Fractionen, ein für die Messung in 1 cm-Küvetten ausreichendes Volumen, auffangen, wobei 15 Tropfen Eluat 1 Milliliter entsprachen. Der Proteingehalt wurde für jede

Fraktion photometrisch ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.2) und das abgetrennte Ammoniumsalz mit Neßler's Reagens nachgewiesen (Abb. 1).

Dabei konnte jedesmal eine gute Trennung der Komponenten erzielt werden. Die proteinhaltigen Fraktionen erwiesen sich stets als ammoniumfrei.

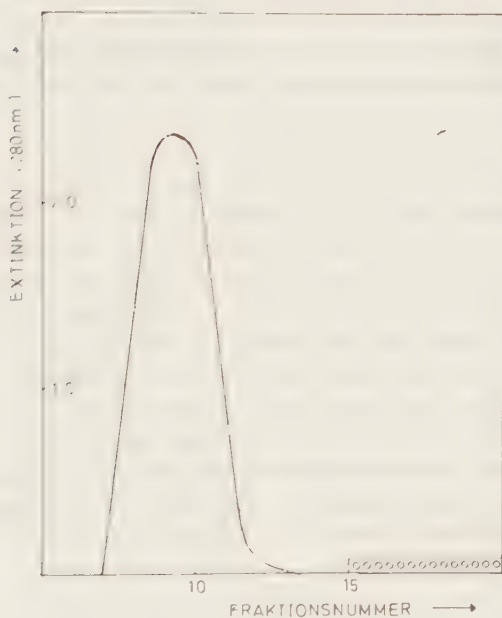


Abb. 1 Typisches Elutionsdiagramm von nativer LDH über Sephadex G-25 fine.
○○○○ = Nachweis des Ammoniumions mit Neßler's Reagens

2.2.1.3 Herstellung des Puffers

Da für alle Versuche der gleiche Puffer verwendet wurde, soll kurz auf seine Herstellung eingegangen werden.

Da das Pufferoptimum des Phosphatpuffers um den Neutralpunkt liegt, eignete er sich gut für die in dieser Arbeit sämtlich bei pH 7,0 durchgeführten Versuche. Die Phosphorsäure liegt bei diesem pH-Wert zum Teil als schwache Säure in Dihydrogenphosphatform und zum anderen Teil als "konjugierte" Base in Hydrogenphosphatform vor (2).

Wir lösten die Salzkristalle des sauren NaH_2PO_4 und des basischen Na_2HPO_4 in Wasser so, daß die Lösungen je 0,1 Mol im Liter enthielten. Das entsprach 13,799 g saures Salz und 35,814 g basisches Salz pro Liter Wasser. Anschließend wurden beide Lösungen unter Kontrolle des vorher sorgfältig geeichten pH-Meters vereinigt, bis sich der pH-Wert 7,0 eingestellt hatte. Dies war nach Zugabe von ca. 2 Teilen basischer zu 1 Teil saurer Lösung erreicht. Der fertige Puffer konnte nun in Flaschen abgefüllt, sterilisiert und verschlossen beliebig lange aufbewahrt werden.

2.2.2 Messung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration wurde durch Messung ihrer UV-Absorption ermittelt. Dazu mußten die eiweißhaltigen Fraktionen nach Entsalzen zunächst einzeln gemessen, dann vereinigt und in 1 cm-QS-Küvetten gegen Bestrahlungspuffer bei einer Spaltbreite von

0,1 mm und einer Wellenlänge von 280 nm gemessen werden. Der Berechnung der jeweils gewünschten Proteinkonzentration lag der Extinktionskoeffizient ϵ einer 0,1%igen LDH-Lösung bei 280 nm zugrunde, dessen Wert $1,44 \left[\frac{\text{ml}}{\text{mg} \cdot \text{cm}} \right]$ beträgt (6, 7). Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt. Durch Verdünnen mit Puffer konnte nach der Beziehung

$$E_{280} \cdot 1,44^{-1} = c \left[\text{mg/ml} \right]$$

die Konzentration der jeweiligen Probe bestimmt werden. Die fertige Enzymlösung wurde in einem mit Parafilm verschlossenen Becherglas im Kühlschrank bis zur Bestrahlung spätestens am folgenden Tag aufbewahrt.

2.2.3 Bestrahlung

2.2.3.1 Bestrahlungsbedingungen

Die Bestrahlungen wurden im wesentlichen unter den gleichen Bedingungen vorgenommen, wie sie ausführlich in früheren Arbeiten beschrieben sind (3, 4, 14, 26). Anstelle von Stickstoff leiteten wir jedoch Stickoxydul (N_2O) 1 1/2 Stunden vor Bestrahlung und weiter während deren Dauer über die Enzymlösung, die bei 2°C durch ein Magnetührstäbchen mit 30 - 40 U/min. ständig umgewälzt wurde. Dadurch war sichergestellt, das sich das Gas gleichmäßig in der Probe verteilte und alle Enzymmoleküle gleichmäßig der Bestrahlung ausgesetzt waren. Die Konzentration des N_2O betrug dann 0,05 Mol/l (vgl. Abschnitt 3.1.2). Bei den relativ kurzen Bestrahlungszeiten konnten die Proben von 0,1 ml für die

Dosiseffektkurven alle 4 oder 5 Minuten entnommen werden. Das N_2O wurde zur Entfernung von Sauerstoff durch eine Pyrogallol-Lösung geleitet, bevor es die Bestrahlungsprobe erreichte.

Zur Einhaltung der Strahlenschutzbestimmungen wurden Strahlenplakette und Personendosimeter getragen und von Zeit zu Zeit Ortsdosismessungen im Bestrahlungsraum durchgeführt.

2.2.3.2 Dosisleistung

Für die Bestrahlungen benutzten wir eine Röntgenröhre Stabilipan 300 der Firma Siemens. Als Bestrahlungsparameter wurden 200 kV Röhrenspannung und 20 mA Heizstromstärke gewählt. Die Filterung entsprach einem 2 mm Al-Filter, bedingt durch die Eigenfilterung der Röhre.

Die Messung der Dosisleistung erfolgte nach einem Verfahren, das von Fricke (27) und Frankenberg (29) beschrieben wird. Das Prinzip beruht auf der UV-Absorptionsänderung des Eisens als Folge der Oxydation vom zwei- zum dreiwertigen Ion durch die Bestrahlung.

Dazu werden folgende Lösungen vorbereitet:

Lösung 1:

$5 \cdot 10^{-1}$ M H_2SO_4 (ein Teil Wasser plus ein Teil 1 N H_2SO_4), 10^{-2} M NaCl (= 0,5844 g/10 ml Wasser), $3,5 \cdot 10^{-2}$ M $CsSO_4$ (= 12,665 g/10 ml Wasser).

Lösung 2:

Man löse 250 g Ammoniumrhodanid (NH_4SCN) in 200 ml Wasser.

Unmittelbar vor der Messung wurden nun 10 ml von Lösung 1 und 39,2 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ auf 100 ml mit aqua bidest. aufgefüllt. Davon wurden je 10 ml (entsprechend dem Volumen der Bestrahlungsproben) 20, 40, 60 usw. Sekunden lang bestrahlt und in Reagenzgläsern aufgehoben. Ca. 10 ml blieben als Nullwert unbestrahlt. Bei 100 ml Gesamtvolumen erhält man so 9 Proben verschiedener Bestrahlungszeit.

Zur Messung wurden je 3 ml bestrahlte Lösung mit je 1 ml der Lösung 2 versetzt, gut umgeschüttelt und die Extinktion des roten Eisenrhodanidkomplexes bei 436 nm bestimmt. Als Nullwert dienten 3 ml unbestrahlte Lösung, ebenfalls mit 1 ml der Lösung 2 versetzt.

Der Rest der bestrahlten Lösungen wurde zusätzlich gegen unbestrahlte Probe (ohne Zusätze) bei 304 nm gemessen. Die gewonnenen Meßwerte, über der Bestrahlungszeit aufgetragen (Abb. 2 und 3) liegen auf einer Geraden, deren Steigung mit Hilfe eines Tischrechners ermittelt wurde. Durch Multiplikation mit einer für den jeweiligen G-Wert (vgl. Abschnitt 3.1.3) charakteristischen Konstanten erhält man die Dosisleistung pro Sekunde, die dann auf 1 Minute bezogen wurde.

Wir bestimmten die Dosisleistung der Röhre in zwei verschiedenen Bestrahlungsgefäßen (Kurven A und B), wobei die Ergebnisse für die beiden Wellenlängen

jeweils gleich waren. Die Meßwerte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

lfd. Nr.	Bestrah- lungszeit (sec)	Extinktion bei 436 nm		Extinktion bei 304 nm	
		A	B	A	B
1	20	0,131	0,142	0,021	0,032
2	40	0,241	0,255	0,060	0,062
3	60	0,371	0,369	0,083	0,098
4	80	0,479	0,467	0,123	0,130
5	100	0,568	0,589	0,152	0,163
6	120	0,705	0,715	0,188	0,174
7	140	0,805	0,835	0,218	0,231
8	160	0,963	0,959	0,252	0,262
9	180	1,070	-	0,284	-

Tab. 1

Die Dosisleistung errechnet sich folgendermaßen:

Die für die Meßreihen A und B bei $\lambda = 436 \text{ nm}$ gefundenen Steigungen betragen jeweils $58 \cdot 10^{-4} \Delta E/\text{sec}$. Der Umrechnungsfaktor von ΔE_{436} in Kilo-Rad ist gleich 7,6. So ergibt sich $58 \cdot 60 \cdot 7,6 \cdot 10^{-4} = 2,65 \text{ krd/min}$. Entsprechend wurden für die Meßreihen A und B bei $\lambda = 304 \text{ nm}$ Steigungen von jeweils $16 \cdot 10^{-4} \Delta E/\text{sec}$ ermittelt. Mit dem Umrechnungsfaktor 28 multipliziert und auf 1 Minute bezogen ergibt sich der Wert 2,69 krd/min. Der Mittelwert der gemessenen Dosisleistungen beträgt 2,67 krd/min.

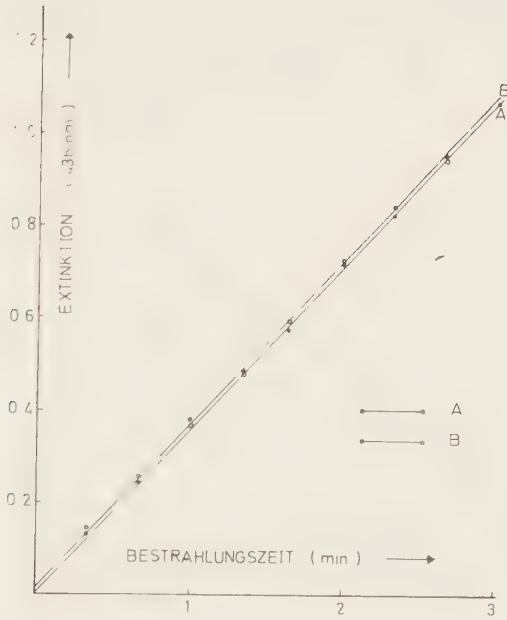


Abb. 2 Zur Fricke-Dosimetrie.
Extinktion des Eisenrhodanids über der Bestrahlungszeit für E_{436} • Kurve A für LDH-, Kurve B für RNase-Bestrahlungsgefäß.

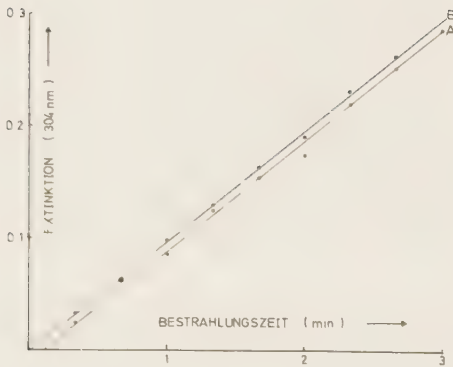


Abb. 3 Zur Fricke-Dosimetrie.
Extinktion der bestrahlten Restproben bei 304 nm
über der Bestrahlungszeit. Kurven A und B wie in
Abb. 2.

2.2.4 Messung der enzymatischen Aktivität

2.2.4.1 Prinzip

Die Aktivität eines Enzyms ist definiert als diejenige Enzymmenge, die die Umwandlung von 1 μMol Substrat in 1 Minute unter Standardbedingungen katalysiert und wird in Internationalen Einheiten (IU = International Unit) angegeben. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich dabei um folgende Reaktion:



Als Katalysator wirkt die Laktatdehydrogenase (LDH), die den Wasserstoff vom Pyridinring des reduzierten Coenzyms auf die Brenztraubensäure (Pyruvat) überträgt. Die Gleichgewichtskonstante für die Milchsäurebildung beträgt bei Zimmertemperatur $3,6 \cdot 10^{11}$, so daß die Reaktion unter den gegebenen Bedingungen in dieser Richtung freiwillig abläuft. Da das NAD^+ zwischen 300 und 400 nm praktisch nicht, die reduzierte Form dagegen maximal absorbiert, läßt sich der Ablauf der Reaktion mit Hilfe des Warburg'schen Testes bequem verfolgen (9, 10).

Dabei entspricht die Abnahme der Extinktion, die bei geeigneter Verdünnung linear verläuft, proportional dem Umsatz von NADH und nach Gleichung I derselben Menge Pyruvat (in Mol), so daß hieraus ein direktes Maß für die Anfangsgeschwindigkeit des Umsatzes (v_0) abgeleitet wird. Läßt man den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für das betreffende Coenzym in die Rechnung eingehen, so kann man den Umsatz (= Enzymaktivität) in Internationalen Einheiten (IU) unmittelbar berechnen.

2.2.4.2 Durchführung

Der Testansatz enthielt folgende Substanzen:

3,00 ml	0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
0,05 ml	NADH (7,1 mg NADH gelöst in 1 ml einer 1%igen Natriumbikarbonatlösung)
0,05 ml	Pyruvat (8,6 mg/ml Wasser)
0,1 ml	Enzymverdünnung

Diese Enzymverdünnung enthielt 1 Teil Enzymlösung und 99 Teile Puffer (1:100). Sie erwies sich meist als geeignet zur Registrierung über das Optilab-System, wobei die Ableseintervalle bei verminderter Aktivität einfach verlängert werden konnten.

Die Enzymtests erfolgten in OS-Küvetten bei 334 nm und Zimmertemperatur. Zum Einpipettieren der kleinen Volumina leisteten die Eppendorf-Mikropipetten hervorragende Dienste.

Die Extinktionswerte wurden vom Optilab-Gerät auf Lochstreifen geschrieben, nach deren Eingabe in eine Rechenmaschine wir die Ergebnisse rasch erhielten ⁺).

2.2.4.3 Auswertung

Tabelle 2 zeigt als Beispiel den Ausschnitt einer Wertetabelle, wie sie der Elektronenrechner aus den Daten des Lochstreifens vermittelte.

⁺) Für die Durchführung der Rechenoperationen sei Herrn Dipl.-Ing. G. Oetken vom Institut für Nachrichtentechnik der Universität Erlangen-Nürnberg gedankt!

Die Spalten haben im einzelnen folgende Bedeutung:

- T = Zeitpunkt (time) der Ablesung in Sekunden,
die Differenz der einzelnen T-Werte ergibt
die Ableseintervalle,
- E (T) = die vom Photometer zum Zeitpunkt T abgele-
sene Extinktion der Probe,
- K = laufende Nummer der Meßwerte,
- M = Extinktionsabnahme pro Sekunde ($\Delta E/\text{sec}$;
 $-03 = 10^{-3}$),
- B = Extinktion E zum Zeitpunkt 0 (= Achsenab-
schnitt auf der y-Achse),
- R = Korrelationsfaktor, der angibt, wie gut
die Extinktionswerte in die Geradenfunktion
(siehe Gleichung II) passen.

Wichtig für die Auswertung sind vor allem die M- und R-Werte. Der Rechner ist so programmiert, daß er fortlaufend von oben nach unten mit je einem weiteren Punkt (Extinktionswert) diejenige Gerade ermittelt, von der die zugehörigen Punkte den kleinsten Abstand haben, wodurch die Korrelation R den jeweils bestmöglichen Wert annimmt. Dieser ist dabei um so besser zu bewerten, je kleiner seine Differenz zu 1 ist.

Am Ende erhält man dann eine Gerade durch alle Punkte der Meßreihe. An Hand des Korrelationsfaktors R läßt sich dann ablesen, an welcher Stelle die Kurve abflacht. Dies ist der Fall, wenn kein Substratüberschuß mehr vorhanden ist oder das Enzym vom entstehenden Produkt zunehmend gehemmt wird. Dieser Teil der Kurve ist für die Berechnung der Enzymaktivität nicht geeignet (siehe Abb. 4).

T	E(T)	K	M	B	R	M	B	R
7	1.143							
14	1.129	2	-2.00-03	1.157	-1.0000			
21	1.113	3	-2.14-03	1.158	-0.9993	-2.29-03	1.161	-1.0000
28	1.098	4	-2.16-03	1.159	-0.9997	-2.21-03	1.160	-0.9998
35	1.083	5	-2.16-03	1.159	-0.9998	-2.19-03	1.159	-0.9999
42	1.067	6	-2.18-03	1.159	-0.9999	-2.20-03	1.160	-0.9999
49	1.051	7	-2.19-03	1.159	-0.9999	-2.22-03	1.160	-0.9999
56	1.035	8	-2.21-03	1.159	-0.9999	-2.23-03	1.160	-0.9999
63	1.019	9	-2.22-03	1.160	-0.9999	-2.24-03	1.161	-0.9999
70	1.003	10	-2.23-03	1.160	-0.9999	-2.25-03	1.161	-0.9999
77	0.987	11	-2.24-03	1.160	-0.9999	-2.25-03	1.161	-0.9999
84	0.971	12	-2.25-03	1.160	-0.9999	-2.26-03	1.161	-1.0000
91	0.957	13	-2.24-03	1.160	-0.9999	-2.25-03	1.161	-0.9999
98	0.941	14	-2.24-03	1.160	-0.9999	-2.25-03	1.161	-1.0000
105	0.927	15	-2.23-03	1.160	-0.9999	-2.24-03	1.160	-0.9999
112	0.911	16	-2.23-03	1.160	-0.9999	-2.23-03	1.160	-0.9999
119	0.895	17	-2.23-03	1.160	-0.9999	-2.23-03	1.160	-0.9999
126	0.880	18	-2.23-03	1.160	-0.9999	-2.23-03	1.160	-0.9999
133	0.865	19	-2.22-03	1.160	-1.0000	-2.23-03	1.160	-0.9999
140	0.850	20	-2.22-03	1.159	-1.0000	-2.22-03	1.160	-0.9999

Tab. 2: Wertetabelle des Elektronenrechners zur Messung der enzymatischen Aktivität (Beispiel einer $7,14 \cdot 10^{-6}$ M LDH-Lösung, die mit 106 krd bestrahlt wurde; übriger Testansatz siehe 2.2.4.2)

Dieser Vorgang der sogenannten Regression wird insgesamt weitere drei Mal wiederholt (in Tabelle 2 nur einmal angedeutet). Dabei wird der zweite Meßpunkt einer Kurvenschar zum Anfangspunkt der folgenden, der erste Wert also jeweils weggelassen, so daß die letzte Gruppe mit dem vierten Meßwert als Anfangspunkt beginnt.

Man sucht sich nun diejenige Gerade aus, deren Korrelationsfaktor R möglichst günstig ist. Sie entspricht dann der Tangente, die an den Anfangsteil der Zeit- Umsatz-Kurve angelegt werden würde (Abb. 4). Im Falle der LDH hat sich gezeigt, daß man selten mit Werten für $R < 0,9990$ zufrieden sein muß.

Da die Inaktivierung von Enzymen exponentiell von der Dosis bzw. der Bestrahlungszeit abhängt (1,13), gilt folgende Beziehung:

$$(II) \quad A = A_0 \cdot e^{-bt} \longrightarrow \ln A = -bt + \ln A_0$$

Hierbei ist

A die gesuchte enzymatische Aktivität,
 A_0 die Aktivität vor Bestrahlung,
t die Bestrahlungszeit

Für A wurden die gemessenen Werte der $\Delta E/\text{sec}$ in die Gleichung II eingesetzt und mit Hilfe des Tischrechners die Werte b, A_0 und Korrelation R ermittelt. Die Restaktivität in Abhängigkeit von der Dosis erhält man in Rel.-%, wenn man $A_0 = 100\%$ setzt und $\Delta E/\text{sec}$ darauf bezieht.

Dividiert man $\ln 2$ durch Steigung b , so erhält man die Bestrahlungszeit in Minuten, nach der die Restaktivität nur noch 50 % beträgt. Diese mit der Dosisleistung (krd/min) multipliziert ergibt die sog. D_{50} . Die Inaktivierungsdosis D_{37} (Restaktivität = 37 %) errechnet sich aus der Division der Dosisleistung durch Steigung b (13).

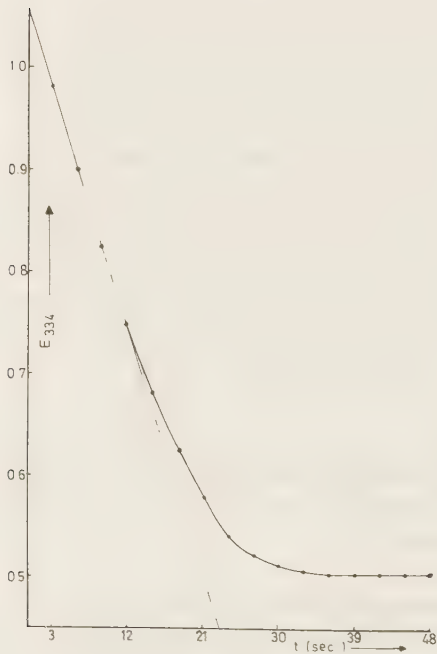


Abb. 4 Zeit-Umsatzkurve einer $3,57 \cdot 10^{-6}$ M LDH-Lösung (= 0,5 mg/ml). Der übrige Testansatz wird in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

2.2.5 Gelchromatographie

Die gelchromatographischen Trennversuche wurden über eine Säule von Sephadex G-200 durchgeführt, die aus einem gelgefüllten Plexiglasrohr bestand. Dieses wurde konzentrisch von einem weiteren Rohr umgeben, wobei der so entstandene Raum der Aufnahme des Kühlwassers (4°C) diente.

Das Gelbett, das eine Höhe von 190 cm und einen Durchmesser von 1,4 cm hatte, wurde auf diese Weise konstant kühl gehalten. Diese Maßnahme diente zusammen mit den in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen Verfahren der Hemmung des Keimwachstums. Bei Kunigk sind die Einzelheiten des Versuchsaufbaues zeichnerisch genau festgehalten.(4)

Da das N_2O , das in Kälte gut löslich ist, bei Erwärmen spontan Bläschen beim Auftragen bildete und dadurch zu dessen Behinderung führte, wurden die bestrahlten Proben etwa 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann in Portionen von 5 - 10 ml für den Versuch verwendet. Auftragen und Ausfluß erfolgten über einen kleinkalibrigen Teflonschlauch, wobei die Fließrichtung aus den von Kunigk (4) angegebenen Gründen von unten nach oben gewählt wurde. Das Eluat floß bei Verlassen der Säule zunächst durch einen Tropfenzähler, der mit einer Photozelle ausgerüstet war, bevor es in Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen wurde. Da pro Versuch nicht mehr als 100 Fraktionen benötigt wurden, konnte bei kontinuierlichem Durchfluß das Chromatogramm nach durchschnittlich 2 - 3 Tagen aufgenommen werden.

Als Fließmittel diente 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0, der nach Sterilisation 30 - 60 Minuten lang mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast werden mußte. Ein Zusatz von Hibitane während der Chromatographieläufe erwies sich zwar im Sinne der Keimzahlreduzierung als nützlich, schien jedoch die Trennergebnisse von bestrahltem Enzym ungünstig zu beeinflussen, so daß wir später auf diese Maßnahme verzichteten.

Die Auswertung der Trennversuche wurde nach den in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Methoden vorgenommen. Weitere Angaben über Wirkungsweise und Vorbereitung des Gels sowie die Versuchsanordnung finden sich bei Determann (5), Kunigk (4), Niemczyk (14) und in den Informationsschriften der Firma Pharmacia (8).

2.2.6 Aktivität im Chromatogramm

Weiter aufschlußreich über die Strahleninaktivierung der LDH unter N_2O schien die Messung der enzymatischen Aktivität, die in den Elutionspeaks vorhanden war. Methodisch wurde dazu gemäß Abschnitt 2.2.4 vorgegangen. Das Maß für die Restaktivität wurde dabei als umgesetzte Substratmenge pro Zeit x Volumeneinheit (= IU/ml) angegeben.

2.2.7 UV-Spektren

Interessant schien auch der Vergleich von UV-Spektren, die an LDH nach Bestrahlung unter N_2 und N_2O gemessen werden konnten. Verglichen wurden

UV-Absorptionsspektren unter N_2 (3) und N_2O sowie
UV-Differenzspektren unter N_2 (14) und N_2O .

Beide Meßverfahren unterscheiden sich im Nullwert, der beim Absorptionsspektrum Bestrahlungspuffer, beim Differenzspektrum dagegen unbestrahltes Enzym ist. Um im Ablesebereich des Photometers zu bleiben, wurden die Proben zur Aufnahme der Differenzspektren 1 : 1 mit Puffer verdünnt und die abgelesenen Extinktionswerte entsprechend korrigiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Verlust der enzymatischen Aktivität

3.1.1 Eichkurve für natives Enzym

Ein geeignetes Maß zur Beurteilung des biochemischen Verhaltens eines Enzyms bildet die enzymatische Aktivität, deren Messung in Abschnitt 2.2.4 beschrieben wird. Abweichungen vom "Standardverhalten" lassen sich dann auf Prozesse am Molekül zurückführen, wenn die übrigen Reaktionsbedingungen definierbar sind und konstant gehalten werden.

Um nun derartige Veränderungen darstellbar zu machen, wird das "Standardverhalten", d.h. die Aktivität unter Standardbedingungen, in Form einer Eichkurve festgelegt. Im vorliegenden Fall handelt es sich um die damit mögliche Erfassung strahleninduzierter Aktivitätsänderungen innerhalb eines bestimmten Enzymkonzentrationsbereiches.

Dazu wurden beispielsweise 0,1 ml Enzymsuspension in der vom Hersteller gelieferten Form mit Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Man erhielt so eine Enzymkonzentration von 1 mg/ml, da 1 ml der Suspension 10 mg Enzym enthielt. Dementsprechend wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, welche die in Abb. 5 angegebenen Konzentrationen enthielt.

Die Angabe der enzymatischen Aktivität, die in Internationalen Einheiten (IU) üblich ist, wurde erweitert durch Umrechnung in spezifische Aktivität mit der Dimension IU/mg Protein.

Sie wird folgendermaßen abgeleitet:

$$\begin{aligned}
 \text{(III)} \quad & \frac{\Delta E \cdot F_1 \cdot F_2}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d \cdot c_{\text{protein}}} \left[\frac{\mu\text{Mol} \cdot \text{ml}}{\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{cm} \cdot \text{mg}} \right] \\
 & = \left[\frac{\mu\text{Mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} \right] = \text{IU/mg}
 \end{aligned}$$

Dabei bedeuten:

- $\Delta E / \Delta t$ die Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit;
 die vom Rechner gelieferten Werte $\Delta E / \text{sec}$
 wurden mit 60 multipliziert,
- F_1 der Verdünnungsfaktor 1, der gleich dem
 Verhältnis von Testvolumen zu Analysen-
 volumen (= Volumen der Enzymverdünnung)
 ist,
- F_2 der Verdünnungsfaktor 2, um den die Enzym-
 probe vor der Messung verdünnt werden mußte,
- ϵ der molare Extinktionskoeffizient für NADH,
 der bei $\lambda = 334 \text{ nm}$ den Wert $6 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$ hat,
- d die Schichtdicke der Probe in cm,
- c_{protein} die bestrahlte Enzymkonzentration in mg/ml
 vor Verdünnung um F_2 .

Die Angaben der spezifischen Aktivität in Abb. 5 wurden aus mehreren Messungen gewonnen. Die Steigung der Eichgeraden und damit die spezifische Aktivität betrug 503 IU/mg, der Wert des y-Achsenabschnitts 0,04 IU/ml. Der mittlere Fehler der Steigung erwies sich mit $\pm 0,1$ IU/mg, der des y-Achsenabschnitts mit $\pm 0,06$ IU/ml als sehr gering. Wiederholt man alle Messungen in einer N_2O -gesättigten LDH-Lösung, so erhält man praktisch unveränderte Werte, was für die relativ unempfindliche Struktur globulärer Proteine gegenüber N_2O spricht (22).

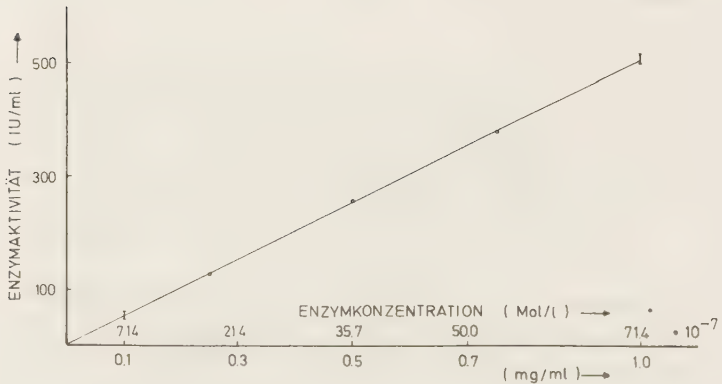


Abb. 5 Eichkurve für die Aktivität der nativen LDH

3.1.2 Dosiseffektkurven unter N_2O und N_2 bei verschiedenen Enzymkonzentrationen

Bestrahlt man eine wässrige Lösung bei N_2O -Sättigung, so werden nach Gleichung IV die entstandenen solvatisierten Elektronen (e^-_{aq}) durch das N_2O abgefangen (37):



Zugleich werden auf diese Weise OH-Radikale in äquimolarem Verhältnis gebildet.

Bestrahlt man eine $7,14 \cdot 10^{-6} M$ LDH-Lösung (= 1 mg/ml) und nimmt an, die Geschwindigkeitskonstante k für die Reaktion der solvatisierten Elektronen mit LDH (wie mit RNase betrage $10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$, so werden nach der Gleichung für kompetitierende Reaktionen (Gl - V; vgl. Abschnitt 4) praktisch alle Elektronen durch N_2O abgefangen:

$$\begin{aligned} (V) \quad w_{e^-} + N_2O &= \frac{c_{N_2O} \cdot k_{e^-} + N_2O}{c_{N_2O} \cdot k_{e^-} + N_2O + c_{LDH} \cdot k_{e^-} + LDH} \\ &= \frac{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9}{0,05 \cdot 8,7 \cdot 10^9 + 7,14 \cdot 10^{-6} \cdot 10^{10}} \\ &= \frac{4,35 \cdot 10^8}{4,35 \cdot 10^8 + 7,14 \cdot 10^4} \\ &= 0,9998 \rightarrow w_{e^-} + N_2O \sim 1,0 \text{ (oder 100 \%)} \end{aligned}$$

Dabei ist $w_{e^- + N_2O}$ die Wahrscheinlichkeit für die Reaktion zwischen e^- und N_2O . Die Konzentration des N_2O (c_{N_2O}) beträgt unter den gegebenen Bedingungen 0,05 Mol/l; $k_{e^- + N_2O}$, die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion zwischen e^- und N_2O , wird mit $8,7 \cdot 10^9 [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ angegeben (38), für $k_{e^- + LDH}$ der Wert $10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ angenommen (vgl. Abschnitt 4). Die Messungen erfolgten bei pH 7 und 2°C, was genau den Bedingungen dieser Arbeit entspricht.

Dabei beträgt der G-Wert für die OH-Radikale 5,35, der für die H-Radikale nur 0,58 (vgl. Abschnitt 4), so daß man davon ausgehen darf, daß etwa 90 % der reagierenden Agentien OH-Radikale sind. Entscheidend für deren Wirksamkeit am Protein ist auch die Tatsache, daß die Reaktionen des Puffer- und des N_2O -Moleküls mit den Radikalen vernachlässigbar langsam abläuft.¹⁾ Daraus folgt, daß die gemessene Inaktivierung der LDH nur durch OH- und H-Radikale bewirkt wird, deren Konzentrationen (vgl. Abschnitt 4) sich etwa wie 9 : 1 verhalten.

¹⁾ Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten haben folgende Werte (38):

$k_{\text{phosphat} + OH^{\bullet}}$	$\geq 10^7$	$M^{-1} \cdot sec^{-1}$
$k_{\text{phosphat} + H^{\bullet}}$	$= 5 \cdot 10^3$	"
$k_{N_2O + OH^{\bullet}}$	$\cong 10^6$	"
$k_{N_2O + H^{\bullet}}$	$= 1,2 \cdot 10^4$	"

Unter den beschriebenen Bedingungen wurden Dosis-effektkurven aufgenommen, wobei nur die Enzymkonzentration im Bereich von 0,1 bis 1,0 mg/ml variiert wurde. Da die Inaktivierungskurven in diesem Bereich exponentiell verliefen, wurde die Restaktivität als meßbarer Strahleneffekt über der Bestrahlungsdosis halblogarithmisch aufgetragen. Dadurch entstehen Gerade, deren Steigungen als Maß für die Inaktivierung direkt miteinander vergleichbar sind.

Wie Abb. 6 - 8 zeigen, sind mit steigender Enzymkonzentration entsprechend höhere Dosen notwendig, um gleiche Restaktivität zu erreichen. Dies ist auch dann der Fall, wenn unter sonst vergleichbaren Versuchsbedingungen anstelle des Elektronenfängers N_2O ein chemisch inertes Gas, etwa Stickstoff oder ein Edelgas, in der bestrahlten Probe anwesend ist. Dieses dient nur der Verdrängung von Sauerstoff aus der Bestrahlungsprobe und gestattet allen Primärradikalen die Reaktion mit dem Protein.

Die in Abb. 7 und 8 eingezeichneten Vergleichskurven E und F weisen dementsprechend eine deutliche Differenz ihrer Steigungen auf.

Kurve E aus Abb. 6 - 8 nach Peuten (33) ist bei einer Enzymkonzentration von 1,0 mg/ml unter N_2 gemessen worden und deshalb gut mit Kurve D (1,0 mg/ml unter N_2O) vergleichbar. Es zeigt sich, daß unter N_2 eine um etwa 30 krd höhere D_{37} benötigt wird. Wie in Abschnitt 4 darzulegen sein wird, sind ähnliche Befunde auch von anderen Autoren bezüglich der unterschiedlichen Gasatmosphären beschrieben worden.

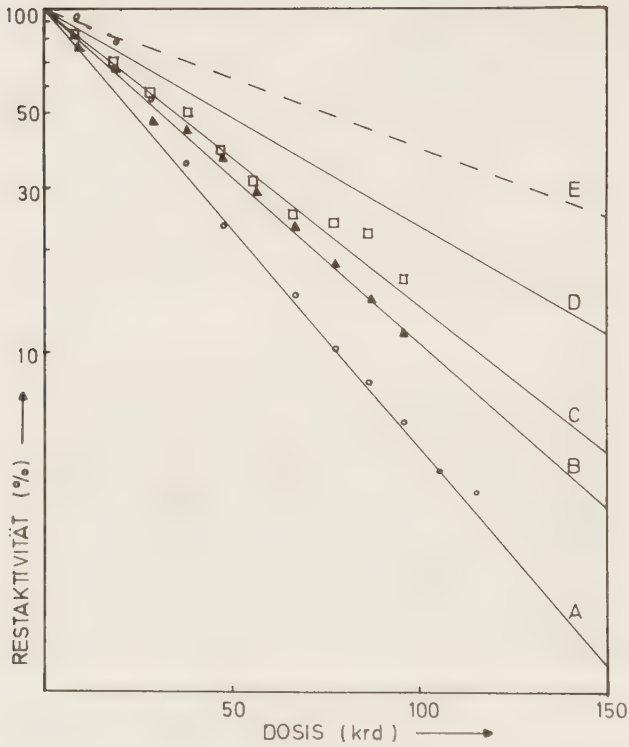


Abb. 6 Dosis-effekt-kurven bei verschiedenen Enzymkonzentrationen unter N_2O .

A: 0,6 ○ — ○ — ○
 B: 0,71 ▲ — ▲ — ▲
 C: 0,83 □ — □ — □
 D: 1,0 (vgl. Abb. 7) —
 E: 1,0 unter N_2 (33) - - - -
 Konzentrationsabgaben in mg/ml

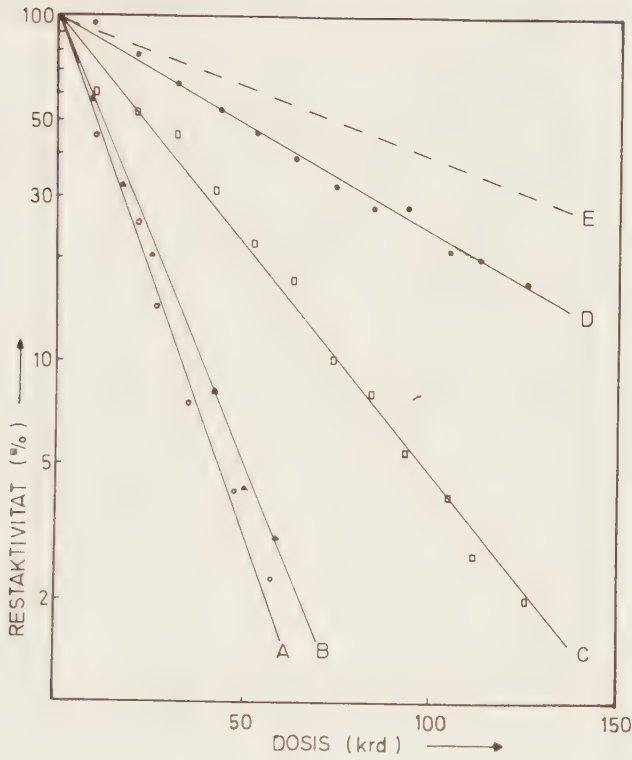


Abb. 7 Dosiseffekturven bei verschiedenen Enzymkonzentrationen unter N_2O

- A: 0,1 ○—○—○—○—○
 B: 0,25 ▲—▲—▲—▲—▲
 C: 0,5 □—□—□—□—□
 D: 1,0 (vgl. Abb. 6) ●—●—●—●—●—●—●
 E: 1,0 unter N_2 (33) - - - - -

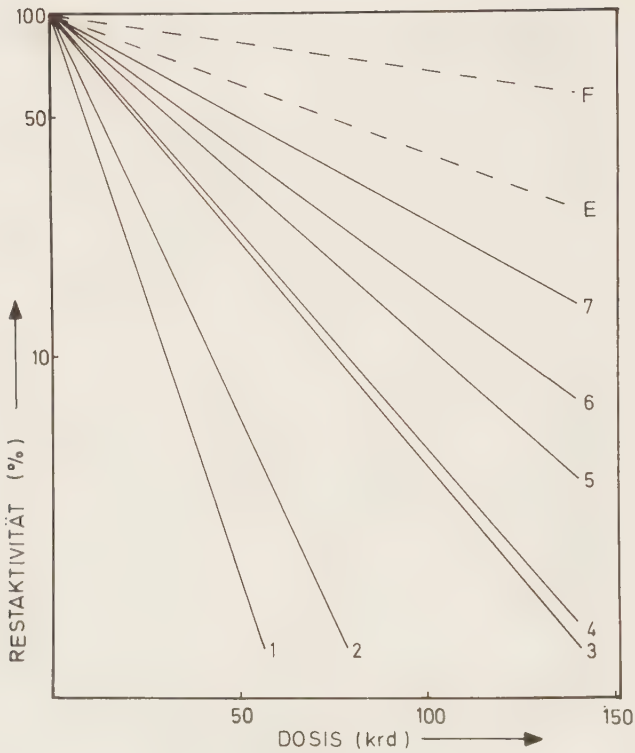


Abb. 8 Zusammenstellung der Dosiseffektkurven in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. Bezifferung der Kurven siehe Tabelle 4, Kurve E siehe Abb. 6 und 7, Kurve F = 3,1 mg/ml unter N₂ (14).

c (mg/ml)	D ₃₇ (krd)	Puffer / pH	Quelle
1,0	106	10 ⁻¹ M Na- triumphosphat- puffer / pH 7,0	Peuten (33)
3,1	280		Niemczyk (14)
1,0	82	0,067 M Na- triumphosphat- puffer / pH 7,1	Kunigk (4)
2,0	139		
3,5	244		
2,0	140	10 ⁻² M Na- triumphosphat- puffer 1 M NaCl / pH 7,2	Denkl (3)

Tab. 3

3.1.3 D_{37} bei verschiedenen Enzymkonzentrationen,
G- Werte

Der im vorigen Abschnitt dargestellte Anstieg der Restaktivität mit der Bestrahlungsdosis läßt sich dadurch quantifizieren, daß man die D_{37} (Berechnung der D_{37} siehe Abschnitt 2.2.4.3) als Bezugsgröße für die Inaktivierung über der Enzymkonzentration aufträgt und der entstandenen Kurve eine Gesetzmäßigkeit zuordnet. Die Enzymkonzentration sei dabei als Anfangskonzentration bezeichnet und entsprechend als diejenige Menge nativen Enzyms, die zu Beginn der Bestrahlung in der Lösung vorhanden war und deren Restaktivität 100 % beträgt, definiert (Enzymkonzentration = Anfangskonzentration setzt die Annahme voraus, daß die Bestrahlung keine Veränderung der Konzentration bewirkt).

Wie Abb. 9 zeigt, ergibt sich eine proportionale Beziehung zwischen Enzymkonzentration und der notwendigen Inaktivierungsdosis D_{37} . Sie läßt sich daher mit Gleichung II (vgl. Abschnitt 2.2.4.3) beschreiben und entspricht der Annahme, daß die Inaktivierungsvorgänge dann exponentiell dosisabhängig und nur durch eine Sorte Primärradikale bedingt ablaufen würden (11). Dementsprechend wird in der Literatur für viele Enzyme ein zur Konzentration proportionaler Anstieg der D_{37} im Sinne einer Linearfunktion gefunden.

Die Meßpunkte in Abb. 9 liegen mit einem Korrelationsfaktor R von 0,98 auf einer Geraden, deren Steigung $65 \pm 3,7$ krd $\cdot$ l/Mol beträgt. Ihr Schnittpunkt mit der y-Achse liegt bei $2,6 \pm 2,4$ krd.

Da der Puffer mit den OH-Radikalen 1000 mal, mit den H-Radikalen sogar 10^6 mal langsamer reagiert als diese mit der LDH, ist der berechnete Wert für den y-Achsenabschnitt für erwartungsgemäß klein zu erachten (38). Verunreinigende Substanzen dürften daher für das Abfangen der Radikale eine vernachlässigbare Bedeutung haben, was die vorliegenden Ergebnisse betrifft. In Fällen, in denen weitere Scavenger- oder Schutzsubstanzen der Bestrahlungslösung zugegeben wurden, fanden sich erheblich höhere y-Achsenabschnittswerte (36). Dem wird daher zu Recht in den mathematischen Formulierungen für Inaktivierungsprozesse dieser Art Rechnung getragen (11).

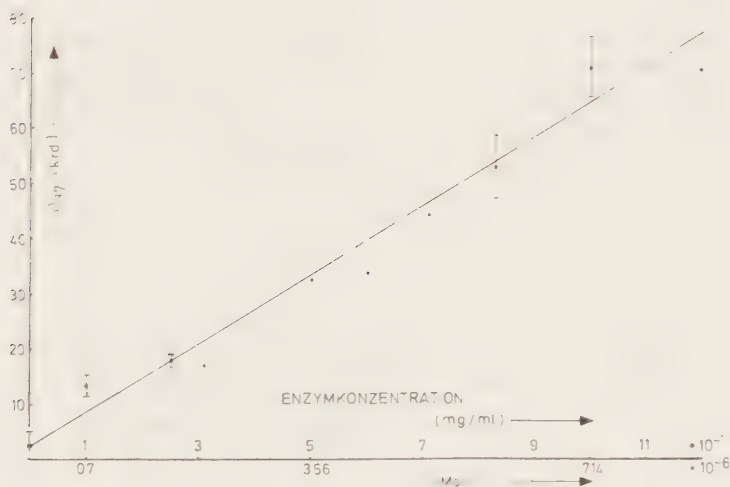


Abb. 9 D₃₇ in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Enzyms

Wie sich die einzelnen D_{37} -Werte unter verschiedenen Bedingungen zueinander verhalten, zeigt Abb. 10, wo alle gefundenen Werte der D_{37} (14, 33) mit denen der vorliegenden Arbeit zum Vergleich über der Enzymkonzentration aufgetragen sind. Dabei wurden auch D_{37} unter differenten Pufferbedingungen berücksichtigt (3, 4).

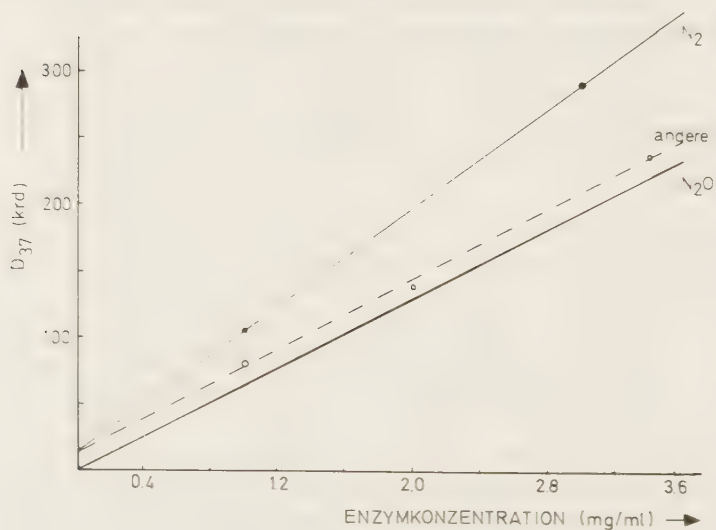


Abb. 10 D_{37} -Werte unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen, aufgetragen über der Enzymkonzentration (Näheres siehe Text)

Die mit " N_2O " gekennzeichnete Gerade ist als Fortsetzung der in Abb. 9 dargestellten Kurve aufzufassen unter der Annahme, daß auch über den gemessenen Konzentrationsbereich hinaus eine lineare Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration besteht. Diese Annahme darf als hinreichend erfüllt gelten, wenn man die Reproduzierbarkeit der Messungen in Abb. 9 auf die übrigen Kurven in Abb. 10 (" N_2 " und "andere") ungeachtet der wenigen Meßpunkte sicher nicht zu Unrecht überträgt.

Die durchgezogenen Geraden zeigen die Abhängigkeit der unter N_2 und N_2O gemessenen D_{37} von der Enzymkonzentration bei sonst gleichen Bedingungen. Der deutlich divergierende Anstieg beider Kurven läßt erkennen, daß der Energieaufwand für die Inaktivierung mit steigender Konzentration unter N_2 in einem bestimmten Verhältnis zur N_2O -Kurve vergrößert werden muß zur Erzeugung gleicher Restaktivität. Parallel zur N_2O -Kurve verläuft die Gerade, auf der die von Denkl (3) und Kunigk (4) gemessenen D_{37} -Werte liegen (Kurve "andere" in Abb. 10; Kurve " N_2 " enthält dagegen die D_{37} -Werte nach Peuten (33) und Niemczyk (14)).

Die Meßbedingungen hinsichtlich Molarität und pH-Wert des Puffers unterscheiden sich zum Teil erheblich von den vorigen (siehe Tabelle 3). Beide Kurven weisen eine Steigung von $65 \text{ krd} \cdot 1/\text{Mol}$ auf. Der zur Erzeugung gleicher Restaktivität notwendige Zuwachs an Inaktivierungsenergie ist also jeweils gleich groß. Die Steigung der N_2 -Kurve beträgt demgegenüber $83 \text{ krd} \cdot 1/\text{Mol}$. Mit dieser gemeinsam hat die Kurve "andere" hingegen den Schnittpunkt mit der y-Achse, der zum entsprechenden N_2O -Wert eine Differenz von 12 krd aufweist.

Als sehr hilfreich für die Aussage über die Wirksamkeit von Radikalen hat sich die Berechnung des G-Wertes erwiesen. Es handelt sich hierbei definitionsgemäß um die Zahl der durch Bestrahlung veränderten Moleküle oder neugebildeten Produkte pro 100 eV. Im vorliegenden Fall gehen wir aus von der Anfangskonzentration des Enzyms und der dazugehörigen D_{37} , bei der 63 % der vorhandenen Moleküle strahlenbedingt verändert worden sein müssen.

Die Enzymkonzentration wird mit Hilfe der Loschmidt'schen Zahl (nach dem Satz von Avogadro) von Mol/Liter auf die Zahl der Moleküle/Liter umgerechnet ($N_L = 6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle $\cdot$ Mol $^{-1}$). Die Dimension der Dosis in krd läßt sich in eV/g überführen, da 1 krd $6,24 \cdot 10^{16}$ eV/g entspricht, so daß die D_{37} in krd in die Gleichung eingesetzt wird. Weiterhin entspricht einer LDH-Lösung von 1 mg/ml die Menge von $7,14 \cdot 10^{-9}$ Mol/g Lösung. Wir erhalten so Gleichung VI:

$$\begin{aligned} \text{(VI)} \quad G &= \frac{0,63 \cdot 7,14 \cdot 10^{-9} \cdot 6,023 \cdot 10^{23} \cdot 10^2 \cdot E}{D_{37} \text{ (krd)} \cdot 6,24 \cdot 10^{16}} \\ &= \frac{4,34 \cdot E}{D_{37}} \end{aligned}$$

E ist dabei die jeweilige Enzymkonzentration in mg/ml.

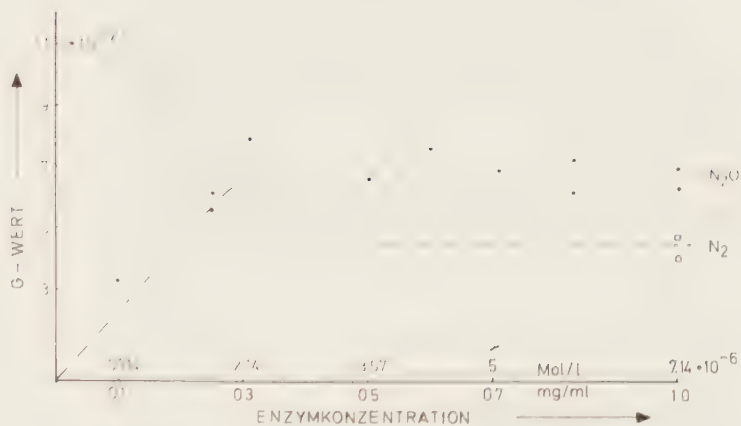


Abb. 11 G-Wert der Inaktivierung in Abhängigkeit von der Anfangskonzentration des Enzyms

Kurven-Nr. in Abb. 8	c (mg/ml)	D ₃₇ (krd)	G-Wert · 10 ⁻²
1	0,1	13,5	3,22
2	0,25	18,3	5,93
3	0,5	32,8	6,62
4	0,6	34,0	7,66
5	0,71	44,6	6,91
6	0,83	53,3	6,76
7	1,0	71,4	6,08
-	1,2	71,0	7,34

Tab. 4

Abb. 11 zeigt die aus den Dosiseffektkurven berechneten G-Werte der Inaktivierung, aufgetragen über der Enzymkonzentration. In Tabelle 4 sind die unter N_2O gemessenen Durchschnittswerte für D_{37} und G-Wert in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration zusammengefaßt.

Die zum Vergleich in Abb. 11 eingezeichneten G-Werte, die unter N_2 gemessen wurden, betragen bei $D_{37} = 106 \text{ krd}$ $4,1 \cdot 10^{-2}$ (33), bei $D_{37} = 280 \text{ krd}$ und $3,1 \text{ mg/ml}$ $4,8 \cdot 10^{-2}$ (14).

Aus dem Kurvenverlauf wird sichtbar, daß erst mit Erreichen einer gewissen Enzymkonzentration (etwa $0,25 \text{ mg/ml}$) die Inaktivierung allein von den gebildeten Radikalen abhängt. Die bei einer Konzentration von 1 mg/ml gefundenen G-Werte sind dabei im Mittel um 45 % größer (unter N_2O) als unter N_2 bei 1 bzw. auch $3,1 \text{ mg/ml}$. Unter N_2O erreicht die Inaktivierung bei sonst gleichen Bedingungen also ein höheres Ausmaß. Darauf konnte an Hand der D_{37} -Werte wie auch der Inaktivierungskurven im vorigen Abschnitt bereits hingewiesen werden.

3.2 Gelchromatographische Untersuchungen

Zahlreiche frühere Arbeiten, die sich mit dem Verhalten bestrahlter Enzyme nach Auftrennung durch Gelfiltration befassen, haben gezeigt, daß innerhalb bestimmter Dosisbereiche mehrere chromatographische Komponenten unterschiedlicher Größe und Eigenschaften entstehen können. Entsprechend den Trenneigenschaften des Dextrangels sind diese "Peaks" mehr oder weniger eindeutig darstellbar.

Da bei der gelchromatographischen Auftrennung der mittlere Stoke'sche Radius wirksam ist, kann man nur bei globulären Proteinen wegen ihres einheitlichen Molekülradius' unmittelbar vom Elutionsvolumen auf das Molekulargewicht schließen (4). Daher hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die Positionen der entstandenen Peaks mit denen globulärer Proteine bekannten Molekulargewichtes zu vergleichen und den Bestrahlungsprodukten ein scheinbares Molekulargewicht zuzuordnen (3, 4, 14, 26).

Denkl (3) und Kunigk (4) zeigten, daß nach Auftrennung bestrahlter LDH über Sephadex G-150 und G-200 zwei Komponenten dargestellt werden können, deren Teilchenradius größer als der nativen Enzyms ist. Shapira (30), Haskill und Hunt (25) wie auch Schüssler und Jung (24) fanden bei bestrahlter RNase ebenfalls Teilchen mit vergrößertem Molekülradius. Diese wurden einerseits im Ausschlußvolumen v_o eluiert, wobei es sich in erster Linie um Molekülaggregate handelte, andererseits wiesen sie ein Elutionsmaximum zwischen Ausschlußvolumen und

Position des unbestrahlten Enzyms auf. Die Vergrößerung dieser Teilchen sollte hauptsächlich durch Entfaltungsvorgänge zustande gekommen sein.

In dieser Arbeit soll nun gezeigt werden, ob der an RNase bereits nachgewiesene Effekt einer verstärkten Aggregatbildung durch OH-Radikale (12, 21) auch für LDH zutrifft bzw. welche Veränderungen überhaupt vorzufinden sind.

Da eine Teilchenverkleinerung durch Bestrahlung nicht zu erwarten war, genügte die Markierung des Ausschlußvolumens sowie der Position des unbestrahlten Enzyms. In Abb. 12 ist die Situation nach Eichung der Gelsäule Sephadex G-200 dargestellt. Die dabei angewandten Arbeitsmethoden wurden in Abschnitt 2.2.5 beschrieben.

Zur Feststellung des Ausschlußvolumens v_o ließen wir Blue Dextran 2000 in einer Konzentration von 1 mg/ml über die Säule wandern. Es handelt sich dabei um ein synthetisches Polysaccharid mit einem mittleren Molekulargewicht von $2 \cdot 10^6$, da nach Angaben des Herstellers im Ausschlußvolumen von G-200 alle Teilchen mit einem Molekulargewicht über $8 \cdot 10^5$ enthalten sind (5). Die Position der nativen LDH entspricht einem Molekulargewicht von 115.000, was darauf beruht, daß der gelchromatographisch wirksame Radius des fast ellipsoiden LDH-Moleküls (31, 32) kleiner ist als dem wahren MG der LDH von 142.000 entspräche. Chromatographiert man eine mit N_2O gesättigte LDH-Lösung, so erscheint der Elutionsgipfel an gleicher Stelle. Das Molekül wird also in seiner Struktur hinsichtlich der Größe nicht meßbar beeinträchtigt (22).

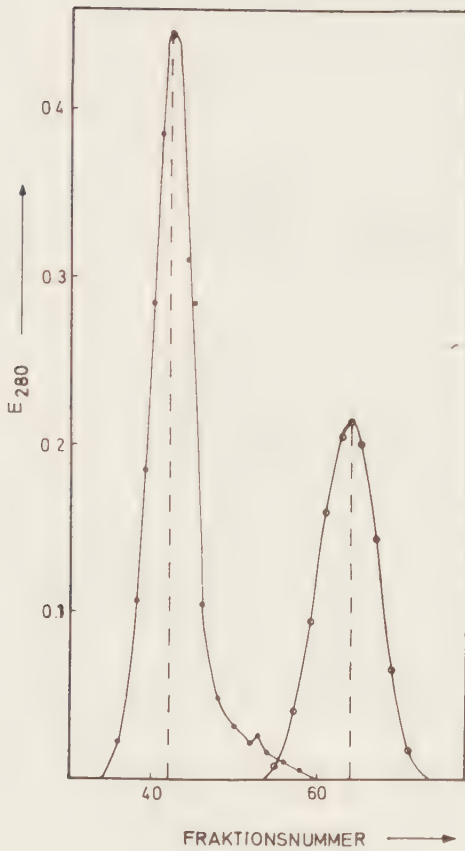


Abb. 12 Ausschußvolumen v_0 bei Fraktion 42 (Blue Dextran) und Nativ-Peak von LDH bei Fraktion 64 an Sephadex G-200

In Abb. 13 sind drei Versuche wiedergegeben, bei denen als einziger Parameter die Strahlendosis und konsekutiv die Restaktivität verändert wurde. Dabei ist festzustellen, daß bereits bei einer Dosis von 96 krd, die einen Aktivitätsverlust von 75 % bewirkt, eine deutliche Aggregation auftritt (Gipfel III⁺), während bei nur wenig geringeren Dosen keine auffälligen Größenveränderungen am Molekül stattzufinden scheinen. Es ist allenfalls eine diskrete Vermehrung der Gruppen II und III bei 72 krd zu diskutieren.

Abb. 14 zeigt im Vergleich von Proben gleicher Restaktivität unter N_2O und N_2 (33), wie unter N_2 nach einer Dosis von 180 krd eine molekulare Größenveränderung im Sinne einer Aggregation gerade erst begonnen zu haben scheint. Dabei verbleibt der größte Teil des Proteins auf der Position des unbestrahlten Enzyms. Chromatographisch sichtbare Veränderungen der räumlichen Ausdehnung des Moleküls bzw. Molekülverbandes, namentlich bedingt durch Aggregation, erfordern demnach unter N_2 bei sonst gleichen Bedingungen weit höhere Dosen als unter N_2O bei Erreichen gleicher Restaktivität.

Ferner bestrahlten wir eine LDH-Lösung mit 1,2 mg Protein/ml Lösung. Die Dosis betrug 108 krd, die erzeugte Restaktivität 22 % (Peuten fand an einer 1 mg/ml LDH-Lösung unter N_2 nach 106 krd immerhin noch 37 % Restaktivität). Im Chromatogramm erscheint nun praktisch alles Protein im Ausschlußvolumen; ein nur verschwindend geringer Teil ist

⁺) Aus früheren Arbeiten (3, 4) wurde die Benennung der einzelnen Peaks durch Bezifferung mit römischen Zahlen übernommen. Ihre Reihenfolge entspricht dem Anwachsen des scheinbaren Molekulargewichtes.

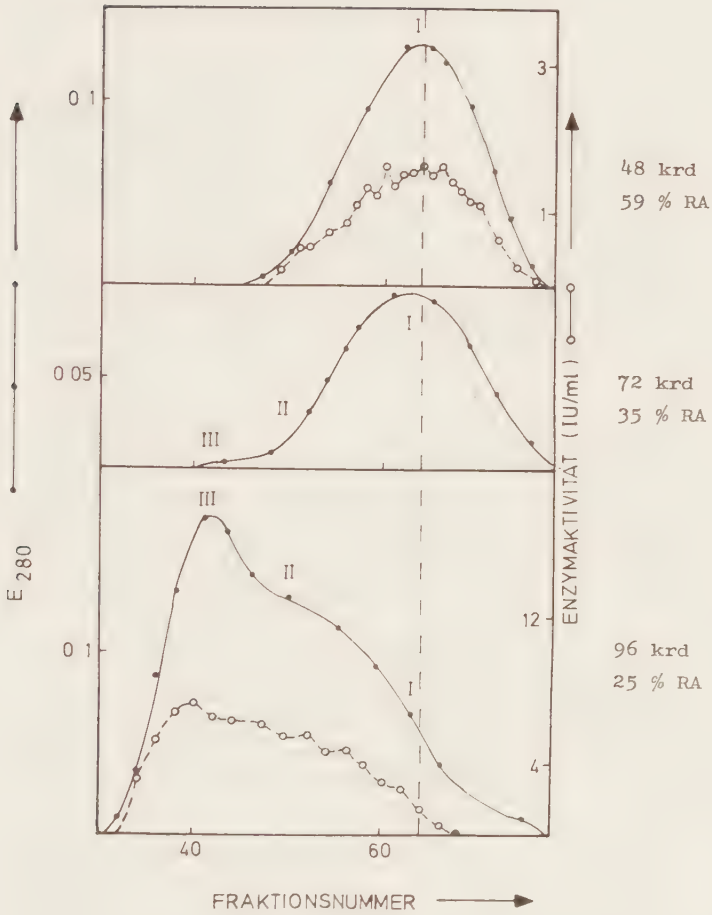
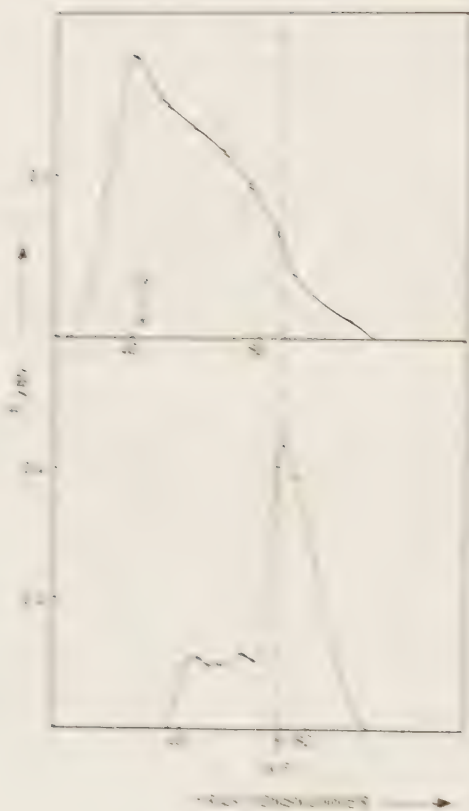


Abb. 13: Auftrennung von Proben gleicher Enzymkonzentration (1 mg/ml) nach Applikation zunehmender Dosen unter N_2O .
RA = Restaktivität



20. 10. 1962
 25. 10. 1962
 unter N_2O
 1 mg, ml.

20. 10. 1962
 25. 10. 1962
 unter N_2
 1 mg, ml.

1. 11. 1962
 2. 11. 1962
 3. 11. 1962
 4. 11. 1962
 5. 11. 1962
 6. 11. 1962
 7. 11. 1962
 8. 11. 1962
 9. 11. 1962
 10. 11. 1962
 11. 11. 1962
 12. 11. 1962
 13. 11. 1962
 14. 11. 1962
 15. 11. 1962
 16. 11. 1962
 17. 11. 1962
 18. 11. 1962
 19. 11. 1962
 20. 11. 1962
 21. 11. 1962
 22. 11. 1962
 23. 11. 1962
 24. 11. 1962
 25. 11. 1962
 26. 11. 1962
 27. 11. 1962
 28. 11. 1962
 29. 11. 1962
 30. 11. 1962
 31. 11. 1962
 32. 11. 1962
 33. 11. 1962
 34. 11. 1962
 35. 11. 1962
 36. 11. 1962
 37. 11. 1962
 38. 11. 1962
 39. 11. 1962
 40. 11. 1962
 41. 11. 1962
 42. 11. 1962
 43. 11. 1962
 44. 11. 1962
 45. 11. 1962
 46. 11. 1962
 47. 11. 1962
 48. 11. 1962
 49. 11. 1962
 50. 11. 1962
 51. 11. 1962
 52. 11. 1962
 53. 11. 1962
 54. 11. 1962
 55. 11. 1962
 56. 11. 1962
 57. 11. 1962
 58. 11. 1962
 59. 11. 1962
 60. 11. 1962
 61. 11. 1962
 62. 11. 1962
 63. 11. 1962
 64. 11. 1962
 65. 11. 1962
 66. 11. 1962
 67. 11. 1962
 68. 11. 1962
 69. 11. 1962
 70. 11. 1962
 71. 11. 1962
 72. 11. 1962
 73. 11. 1962
 74. 11. 1962
 75. 11. 1962
 76. 11. 1962
 77. 11. 1962
 78. 11. 1962
 79. 11. 1962
 80. 11. 1962
 81. 11. 1962
 82. 11. 1962
 83. 11. 1962
 84. 11. 1962
 85. 11. 1962
 86. 11. 1962
 87. 11. 1962
 88. 11. 1962
 89. 11. 1962
 90. 11. 1962
 91. 11. 1962
 92. 11. 1962
 93. 11. 1962
 94. 11. 1962
 95. 11. 1962
 96. 11. 1962
 97. 11. 1962
 98. 11. 1962
 99. 11. 1962
 100. 11. 1962

In der Position des unbestrahlten Enzyms zu finden (siehe Abb. 15).

Kunigk (4) konnte bereits zeigen, daß der Anteil des Aggregates mit steigender Enzymkonzentration zunimmt. Dies ist nach oben Getragenes auch dann der Fall, wenn die Restaktivität gleichgroß bleibt und folglich mit einer höheren Dosis bestrahlt worden war. Dagegen führte die Bestrahlung einer 1 mg/ml LBB-Lösung mit 120 krad unter N_2 ad hoc zu einer so starken Ausfällung, daß die Probe nicht mehr chromatographierbar war.

Mißt man die enzymatischen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen (in Abschnitt 2.2.6 beschrieben), so zeigt sich mit dem Anwachsen des vergrößerten Proteinanteils (Gruppen II und III) eine Zunahme ihrer Aktivität auf Kosten des abnehmenden "unbeschädigten" Anteils der Gruppe I.

Eindeutig erkennbar ist der Aktivitätsgipfel über Gruppe III. Das Aggregat enthält also die Hauptmenge derjenigen Moleküle, deren enzymatische Wirksamkeit durch die Bestrahlung nur relativ wenig beeinträchtigt worden zu sein scheint.

Die Wahrscheinlichkeit einer $OH^\bullet$ -spezifischen Wirkung gewinnt dadurch an Gewicht, daß einerseits Niemczyk im Aggregat unter N_2 praktisch keine Enzymaktivität finden konnte (siehe Abb. 16), andererseits der wachsende Anteil aktiven Enzyms mit zunehmender Aggregation auch für Peroxidase belegt wird (20).

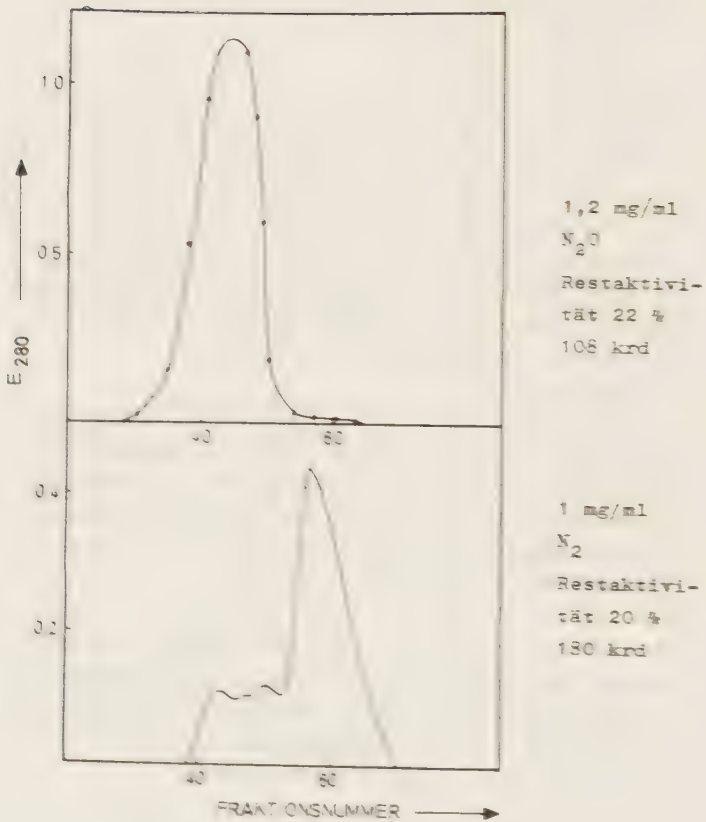


Abb. 15: Auftrennung von Proben gleicher Restaktivität, die unter N_2O mit 108 krd 1,2 mg/ml und unter N_2 mit 180 krd 1 mg/ml bestrahlt wurden. Beide Versuche in 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0. Das untere Diagramm stammt aus der Arbeit von Feuten (33).

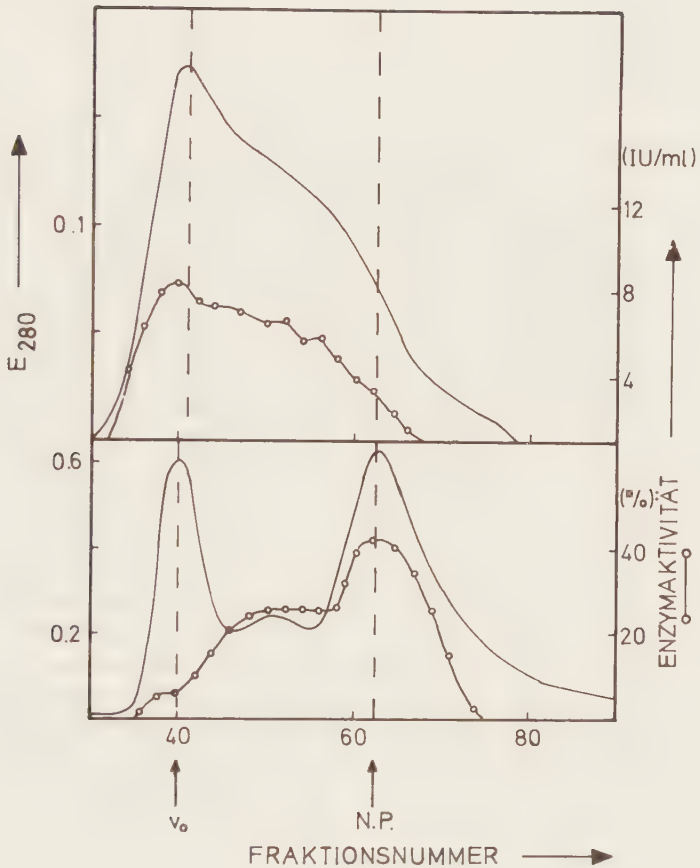


Abb. 16: Verteilung der Enzymaktivitäten bei Proben gleicher Restaktivität.

Oben: unter N_2O

Unten: unter N_2 nach Niemczyk (14).

N.P. = Nativ-Peak

Proteine absorbieren ultraviolette Licht bei Wellenlängen von 250 bis 310 nm. Dies wird vor allem den aromatischen Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan zugeschrieben, deren Absorption zu einem Maximum bei 280 nm führt. Änderungen des typischen Spektrums, das durch Messung bestrahlter und nativer LDH gegen Bestrahlungspuffer entsteht (Abb. 17), dürften daher auf Prozesse an diesen sogenannten Chromophoren zurückzuführen sein. Wetlaufer (34) nennt darüberhinaus Veränderungen der Carboxylionisation und der Konformation, die gegenseitig nicht ohne Einfluß aufeinander sein dürften.

Vergleicht man die UV-Spektren von LDH nach Bestrahlung unter N_2O mit entsprechenden Untersuchungen von Denkl (3), so läßt sich zunächst in beiden Fällen eine Extinktionserhöhung dosisabhängig über das gesamte Spektrum erkennen. Diese beruht nach Weber und Teale (54) auf einer Zunahme der Streustrahlung, die durch strahleninduzierte Vergrößerung der absorbierenden Teilchen bedingt wird. Es fällt jedoch auf, daß nach Denkl die Extinktion bei 280 nm für 226 krd niedriger als für 96 krd ist, während unter N_2O die Extinktion bei 280 nm für 97 krd gegenüber 48 krd deutlich erhöht ist. Diese Beobachtung, in Abschnitt 3.4 bestätigt (Abb. 19), findet eine Erklärung darin, daß unter N_2O bei 97 krd eine wesentlich stärkere Aggregation auftritt als sie Denkl bei 96 bzw. 226 krd unter seinen Versuchsbedingungen (siehe Tabelle 3) messen konnte. Die Zerstörung aromatischer Aminosäuren unter N_2O kann also als Extinktionsverlust im UV-Spektrum nicht sichtbar gemacht werden,

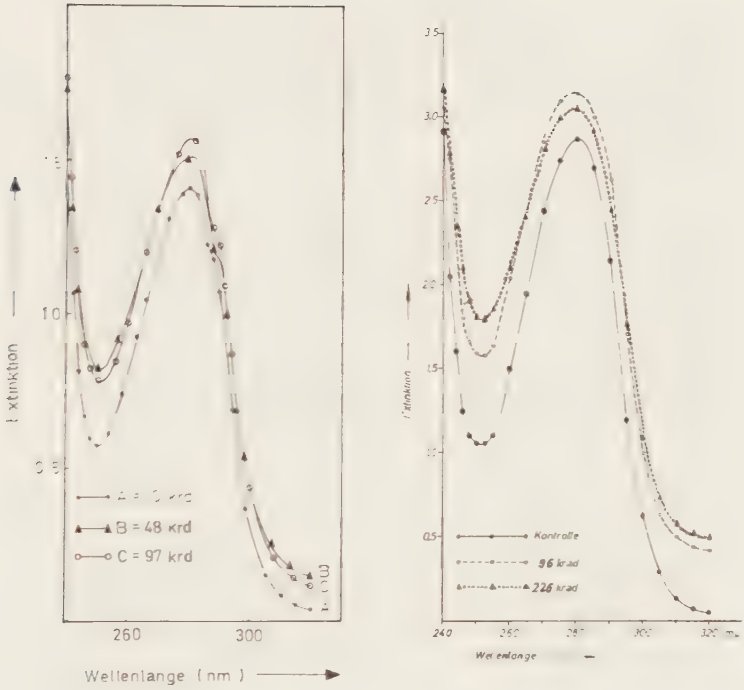


Abb. 17 UV-Absorptionspektren

links: unter N_2O gegen 0,1 M Phosphatpuffer,
rechts: unter N_2 nach Denkl (3).

da sie durch verstärkte Streustrahlung überkompensiert wird. Die Extinktionen bei 250 und 320 nm, die sich unter N_2O umgekehrt zu den Messungen Denkls verhalten, können damit jedoch nicht befriedigend erklärt werden. Dagegen fanden wir im gesamten Spektrum zwischen 288 und 290 nm eine Schulter, wie sie von Eichhorn (26) an unbestrahlter LDH bereits beobachtet wurde.

Weitgehende Übereinstimmung zeigten dagegen die Befunde der UV-Differenzspektren im Vergleich mit den Messungen von Niemczyk (14). Abb. 18 zeigt links die Kurvenverläufe einer 1 mg/ml LDH-Lösung nach Bestrahlung mit $A = 24$, $B = 48$ und $C = 97$ krd unter N_2O . Niemczyk benötigte zur Erzeugung ähnlicher Kurvenbilder an 0,7 mg/ml LDH-Lösung unter N_2 , aber gleichem Puffer, 134, 268 und 400 krd.

Auffällig ist das Verhalten von Kurve C (97 krd unter N_2O), die im Bereich um 280 nm eine starke Verminderung der Extinktionsdifferenz zu nativer LDH mit sofortigem steilen Anstieg aufweist. Möglicherweise ist dies Ausdruck dafür, daß die chromophoren Aminosäuren durch die OH-Radikale weniger stark "beschädigt" werden, als es hinsichtlich ihrer Ausbeute und Effektivität (siehe Abschnitt 4) zu erwarten wäre.

Da sich die Kurvenverläufe im übrigen nur wenig voneinander unterscheiden, könnte der Schluß folgen, daß zumindest ähnliche Prozesse, soweit mit Hilfe eines UV-Spektrums darstellbar, während der Bestrahlung in den unterschiedlichen Gasatmosphären am Enzymmolekül abzulaufen scheinen. Die allgemeine Erhöhung der Extinktion nach Bestrahlung (vgl. Abschnitt 3.4) ist

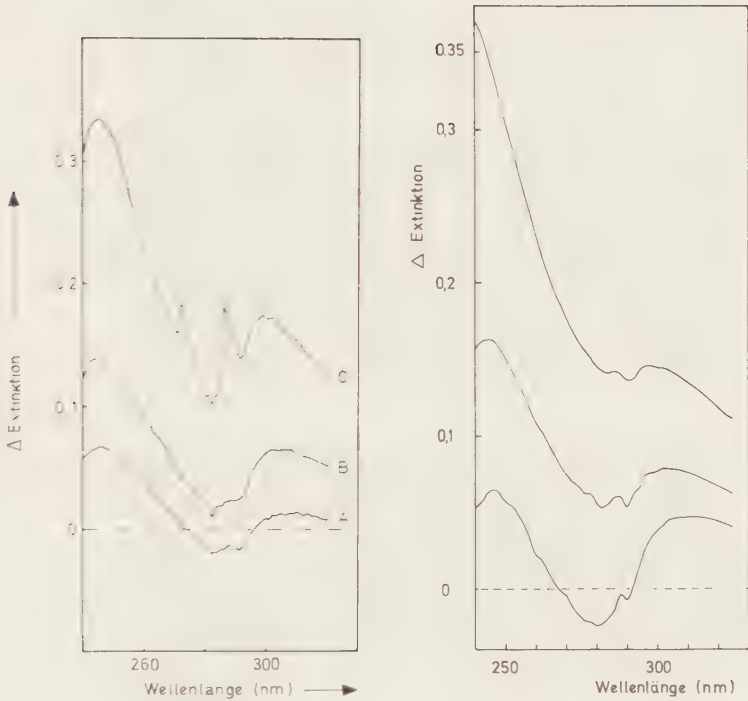


Abb. 18 UV-Differenzspektren von LDH nach Bestrahlung unter N_2O (links) und N_2 . Das rechte Diagramm ist der Arbeit von Niemczyk (14) entnommen.
links: A = 24, B = 48, C = 97 krd,
rechts: von unten nach oben 134, 268 und 400 krd.

sicher in jedem Fall zum großen Teil auf die Zunahme des Streulichtanteils zurückzuführen, der durch die Vergrößerung der Moleküle bedingt ist.

Da der wesentliche Unterschied zwischen den verglichenen Spektren unter verschiedenen Gasatmosphären in der Höhe der Bestrahlungsdosen zu liegen scheint, haben wir die Interpretation über die Entstehung der Spektren den früheren Arbeiten entnommen (3, 14). Festgehalten zu werden verdient somit nur die Tatsache, daß der Energieaufwand unter N_2O weitaus geringer ist als unter N_2 .

Genauere Auskünfte über die spektralen Veränderungen, die entscheidend beeinflußt werden durch Alteration bzw. Zerstörung gewisser Aminosäurereste, ist jedoch nur von einer Aminosäureanalyse zu erwarten. Offinger (35) hat sich im Rahmen seiner Arbeit mit allgemeinen Veränderungen der Primärstruktur, Metzger (39) im besonderen mit dem Abbau von Tryptophan in LDH nach Röntgenbestrahlung beschäftigt. Nach ihren Messungen scheint vor allem diese Aminosäure gegenüber OH-Radikalen am empfindlichsten zu sein.

3.4

Nachreaktionen

Die gelchromatographischen Untersuchungen hatten zu der Vermutung geführt, daß im Dosisbereich zwischen 72 und 96 krd sich jene Prozesse entwickeln würden, die zu einer zunehmenden, bei weniger als 120 krd bereits vollständigen Aggregation und Entfaltung der Enzymmoleküle führen (immer eine Enzymkonzentration von 1 mg/ml angenommen). Dagegen reagierte das Protein auf geringere Strahlendosen und damit weniger OH-Radikale (pro Volumeneinheit) nur zögernd mit Veränderungen seiner ursprünglichen Größe.

Daneben konnte wiederholt die Beobachtung gemacht werden, daß Enzymlösungen, die nach Bestrahlung unter N_2O nicht zu weiteren Messungen verwendet wurden, trotz sorgfältiger Aufbewahrung im Kühlschrank rasch trübe wurden und das Protein schließlich ausfiel. Dies war überraschenderweise auch dann der Fall, wenn die Lösungen am Ende der Bestrahlung noch vollkommen klar waren.

Da alle diese Erscheinungen besonders deutlich bei Dosen von etwa 60 bis 120 krd auftraten, während bei kleineren Dosen nicht einmal eine Nachtrübung, bei größeren dagegen eine spontane Ausfällung Folge der Bestrahlung war, deutete sich eine gewisse Dosisabhängigkeit, hinweisend auf die Ergebnisse der Gelchromatographie, zweifellos an.

Die Frage der versuchsweisen Quantifizierung der Trübungen konnte durch Messung der Extinktion bei 280 nm gelöst werden. Dies schien um so berechtigter,

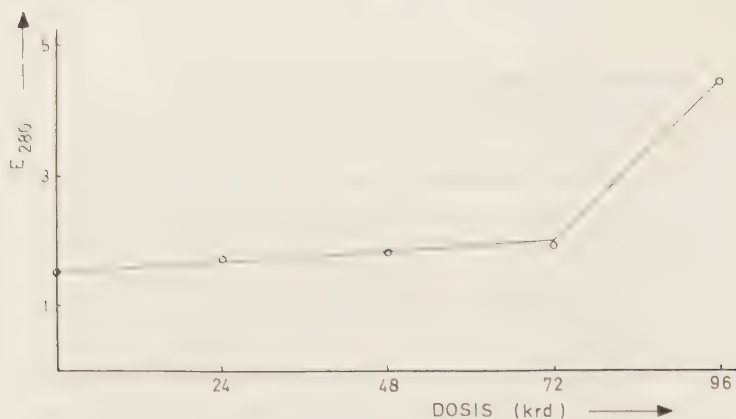


Abb. 19 Dosisabhängige Extinktionszunahme innerhalb einer Stunde nach Bestrahlung gemessen. Die Proben sind 1 : 50 verdünnt und die Extinktionswerte entsprechend umgerechnet angegeben.

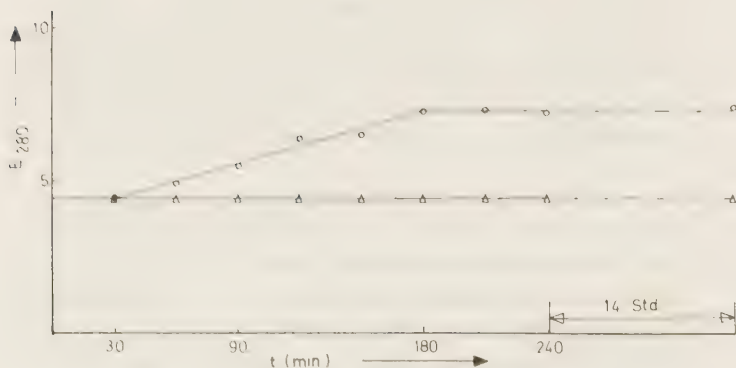


Abb. 20 Extinktionsänderung der bestrahlten Probe in Abhängigkeit von der Zeit nach der Bestrahlung. Zeitpunkt Null = Zeitpunkt der 96 krd-Messung in Abb. 19.

○—○—○—○—○

Probe unverdünnt bei Zimmertemperatur

△—△—△—△—△

Probe 1 : 50 verdünnt im Kühlschrank

als bereits die UV-Spektren (vgl. Abschnitt 3.3) auf deutliche Extinktionsunterschiede schon bei niedrigen Dosen aufmerksam gemacht und sich dadurch als hinreichend geeignet angeboten hatten.

Wir bestrahlten also eine 1 mg/ml LDH-Lösung unter den bisher in dieser Arbeit gepflegten Bedingungen mit einer Gesamtdosis von 96 krd. Während der Bestrahlung wurden bei 24, 48, 72 und endlich bei 96 krd Proben entnommen, deren Extinktion bei 280 nm gegen Puffer photometrisch ermittelt wurde. Zugunsten einer genaueren Ablesung der Photometerskala wurden die Proben zuvor im Verhältnis 1 : 50 (= 1 Teil der Probe auf 49 Teile Puffer) verdünnt und die Meßwerte für die Graphik in Abb. 19 und 20 entsprechend umgerechnet. Die Messungen erfolgten innerhalb einer Stunde nach der Bestrahlung.

Abb. 19 zeigt das Verhalten der Extinktion in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Nach einem leichten, praktisch linearen Anstieg bis 72 krd wächst der Wert bei 96 krd um 125 % des 72 krd-Wertes sprunghaft an. Analog zu den Ergebnissen der Gelchromatographie könnte die hier wie dort bei 96 krd überraschend starke Veränderung mit einer plötzlich eintretenden, unverhältnismäßig starken Größenzunahme des Moleküls gedeutet werden. Dieses Ereignis träte danach dann ein, wenn eine bestimmte Schwellendosis und damit eine bestimmte Schwellenkonzentration an OH-Radikalen erreicht wird.

Die Messung der Extinktion wurde nach der Bestrahlung unter zwei verschiedenen Bedingungen fortgesetzt. Dabei entspricht der Ordinatenwert zum Zeitpunkt Null in Abb. 20 dem Wert bei 96 krd in Abb. 19,

der seinerseits etwa eine Stunde nach Bestrahlungs-
ende gemessen wurde. Der Meßansatz für diesen Wert
wurde (1 : 50 verdünnt) unverändert im Kühlschrank
aufbewahrt und nach jeweils 30 Minuten einer Mes-
sung unterzogen. Seine Extinktionswerte sind in
Abb. 20 in der unteren Kurve wiedergegeben. Sie
bleiben über insgesamt 18 Stunden konstant. Gleich-
zeitig wurde aus der Restlösung, die im Bestrah-
lungsgefäß bei Zimmertemperatur belassen wurde, vor
jeder Messung in 30-minütigem Abstand eine Probe
entnommen, verdünnt und gemessen. Nach einer Stun-
de beginnen die Werte wieder zu wachsen, um nach
3 Stunden einen über weitere 14 Stunden konstanten
Wert anzunehmen. Während dieser 14 Stunden wurde
die Lösung jedoch gekühlt aufbewahrt.

Die Messung einer mit 110 krd bestrahlten Probe,
deren Extinktion im Verlauf der Bestrahlung von
1,44 auf 3,7 und nach 24-stündiger Aufbewahrung
im Kühlschrank auf 6,14 anwuchs, schließt aber den
Effekt einer bloßen Wärmedenaturierung aus. Dabei
zeigt, wie auch im vorigen Versuch, ein zunehmender
Tyndall-Effekt eine mikroskopisch erkennbare Ver-
dichtung der Lösung an, ohne einen Niederschlag
aufzuweisen. Der Versuch, diese Lösung eine Stunde
nach Bestrahlung zu chromatographieren, mußte auf-
gegeben werden, da das Protein bereits im zuführen-
den Filtersystem ausfiel.

Drei Tage danach wurde die Restprobe, die nun wohl
stärker getrübt, aber immer noch ohne Niederschlag
war, unmittelbar auf das Gel aufgetragen. Auch die-
ser Versuch mußte abgebrochen werden, nachdem die
Probe in den obersten Gelschichten ausgefallen war
und den Durchfluß dadurch verhindert hatte.

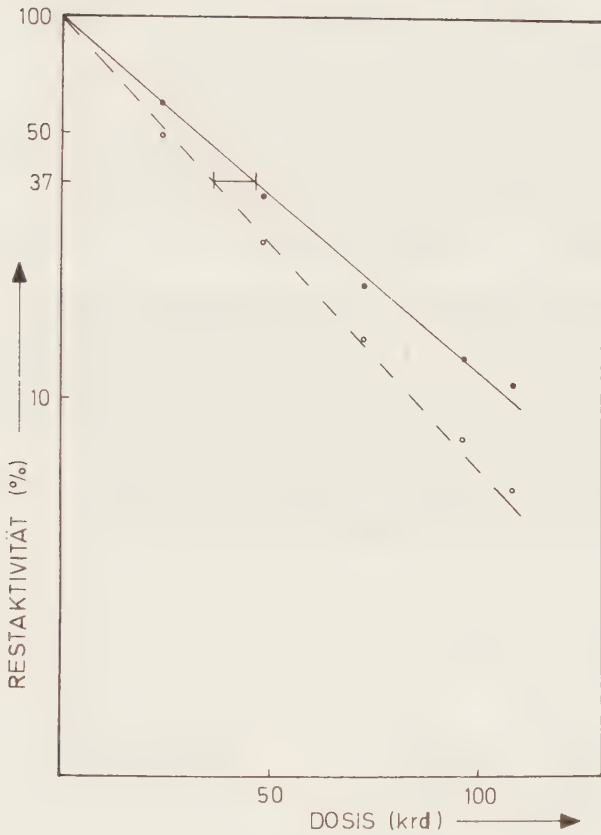


Abb. 21 Dosiseffektcurven 2 Stunden (●—●—●) und 2 Tage (○—○—○) nach Bestrahlung gemessen

Alle diese Beobachtungen lassen den Eindruck entstehen, als liefen in der bestrahlten unverdünnten Lösung Nachreaktionen ab, die ohne äußere Einflüsse wie Wärme oder Licht zu einer weiteren Vergrößerung der Enzymmoleküle und, wie Abb. 21 zeigt, auch zu deren Aktivitätsverlust beitragen. Immerhin beträgt der Abfall der D_{37} nach 2 Tagen etwa 10 krd und liegt damit weit außerhalb einer maximalen Abweichung von 5 krd (vgl. Abb. 9).

Die von Kunigk (4) und Niemczyk (14) nach einer Woche resp. 9 Tagen unter N_2 gefundene Konstanz der Meßergebnisse läßt sich unter N_2O nicht wiederholen. Die in Abb. 9 demonstrierte Korrelation $R = 0,98$ kann jedoch damit erklärt werden, daß die Aufnahme der Dosiseffektkurven in Abb. 9 in regelmäßigen, 18 bis 24 Stunden betragenden zeitlichen Abständen nach den Bestrahlungen erfolgte.

Die vorliegende Arbeit diente dem Versuch, die Einwirkung von OH-Radikalen auf LDH zu untersuchen. Dazu wurde das Enzym in 0,1 M Phosphatpuffer bei neutralem pH gelöst und nach Sättigung mit N_2O einer Röntgenbestrahlung unterworfen.

Unter diesen Bedingungen werden nach Gleichung IV praktisch alle durch Radiolyse des Wassers entstehenden solvatisierten Elektronen (e^-_{aq}) durch N_2O abgefangen. Weiterhin entstehen OH^- -Ionen, die abgepuffert werden und so das pH nicht verändern können. Zusätzlich werden OH-Radikale erzeugt, und zwar pro Mol e^-_{aq} ein Mol $OH^\bullet$ (plus ein Mol OH^-), so daß der Anteil der H-Radikale nur 10 % der reagierenden Radiolyseprodukte ausmacht (über die Berechnung siehe Abschnitt 3.1.2). Die am Enzym zu beobachtenden Veränderungen sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Reaktion der OH-Radikale mit dem Protein zurückzuführen.

Leitet man dagegen N_2 oder ein Edelgas durch die Lösung, wird dadurch der Sauerstoff verdrängt, der ebenfalls die e^-_{aq} und zusätzlich H-Radikale unter Bildung von O_2^- - und HO_2^- -Radikalen abfangen würde, die ihrerseits zur Inaktivierung des Enzyms beitragen können (40). Unter derartigen Bedingungen kann man die Wirkung mehr oder minder aller Primärradikale studieren, wie dies an LDH und anderen Enzymen bereits ausführlich geschehen ist.

Die Wirkung der OH-Radikale an LDH wurde in dieser Arbeit an folgenden Kriterien gemessen:

- a) Verlust der enzymatischen Aktivität, aufgezeigt an Hand von Dosiseffektkurven und den daraus berechneten D_{37} - und G-Werten (Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3),
- b) Veränderung der Molekülgröße, feststellbar durch Gelchromatographie, und damit verbundene Aktivitätsveränderungen (Abschnitt 3.2),
- c) Änderung der UV-Absorption, was in UV-Absorptions- und -differenzspektren dargestellt wurde (Abschnitt 3.3).
- d) Zusätzlich wurden "Nachreaktionen" beobachtet, über die in Abschnitt 3.4 berichtet wurde.

Bei der Aufnahme der Dosiseffektkurven konnte gezeigt werden, daß die Inaktivierung über den gemessenen Konzentrationsbereich stets in exponentieller Abhängigkeit von der Dosis erfolgte, die in Gleichung II zum Ausdruck kommt (Abb. 6 und 7).

Dieses Verhalten wird für Peroxidase (20), Chymotrypsin und Trypsin (41), Ribonuklease (12, 15, 21, 23 - 25 und 42), Alkoholdehydrogenase (40) und auch für LDH (3, 4, 14, 26, 33, 35 und 36) bestätigt, wobei die verschiedenen Gasatmosphären sowie zusätzlich eingebrachte Radikalfänger keine Rolle spielen.

Lediglich Sanner und Pihl (11) fanden bei Papain eine lineare Beziehung, die dadurch bedingt sein soll, daß nur eine SH-Gruppe, die für die Integrität des enzymatischen Zentrums wichtig ist, bevorzugt von den Primärradikalen angegriffen wird.

Die unter N_2O an LDH gewonnenen D_{50} -Werte fallen gegenüber jenen unter N_2 etwa um den Faktor 1,3 niedriger aus. Die Bestrahlung unter N_2 erfordert bei sonst vergleichbaren Bedingungen eine rund 30 % höhere Dosis. Da unter N_2O hauptsächlich OH-Radikale auf das Enzym einwirken, müßte der höhere Aktivitätsverlust diesen Primärradikalen zuzuschreiben sein.

Zu diesem Schluß kommt Adams (21), der an RNase unter N_2O eine nur halb so hohe Inaktivierungsdosis benötigt als zur Erzeugung gleicher Restaktivität unter Ar. Außerdem konnte er nach Ausschaltung aller OH-Radikale durch tertiäres Butanol nur ein Zehntel der Strahlenempfindlichkeit nachweisen, die am Enzym ohne t-Butanol unter sonst gleichen Bedingungen meßbar war. Dasselbe Ergebnis lag auch dann vor, wenn N_2O (als Elektronenfänger und OH'-Erzeuger) mit t-Butanol als OH'-Fänger kombiniert wurde.

Die solvatisierten Elektronen schienen also, wie anderweitig bestätigt (40, 41 und 52), keinen meßbaren Beitrag zur Inaktivierung zu leisten. Dasselbe mußte aber auch für die H-Radikale gelten, da ihre ausschließliche Wirkung in diesem System ja untersucht wurde.

Zu einer gegensätzlichen Beurteilung der Radikalwirksamkeit kommen hingegen Adelstein et al. (12). Durch Erhöhung der H^+ -Konzente im (zunehmend) saurem Milieu nach Gleichung VII: $e^-_{aq} + H_2O \longrightarrow H^+ + H_2O$ erreichten sie höhere Inaktivierungs-raten und folgerten daraus, daß die Wirkung der H-Radikale der für die Inaktivierung primär verantwortliche Mechanismus sei. Dabei blieb jedoch unberücksichtigt, daß die Konformation der meisten Proteine, so auch der von diesen Autoren untersuchten RNase, in saurer werdenden Milieu durch Absättigung der basischen Gruppen an Stabilität verlieren muß.

Es ist daher leicht vorstellbar, daß schon die kleinste (nicht kompensierte) räumliche Veränderung am aktiven Zentrum infolge Verschiebung der Coulomb'schen Kräfte durch Ladungsänderung zu einer Einschränkung der Substratbindungsfähigkeit und damit zur Aktivitätsabnahme führen kann. Bei der gemessenen Erhöhung der Substratbindungsfähigkeit in saurer Lösung könnte es sich also durchaus um Messungen an Enzym handeln, das durch Sauredenaturierung bereits vorgeschädigt war.

Die Berechnung der Radikalkonzentration unter N_2O und N_2O ergibt, daß auch ohne Änderung des pH-Wertes in enzym-schädigende Bereiche eine Verteilung möglich ist. Die in neutraler wässriger Lösung gemessenen G-Werte betragen unter N_2 :

G	(OH $^{\bullet}$)	=	2,7
G	(H $^{\bullet}$)	=	0,58
G	(e $^-_{aq}$)	=	2,65

Da die Bestrahlungen in 0,1 M Phosphatpuffer vorgenommen wurden, ändern sich die G-Werte aufgrund der Reaktion mit dem Phosphatmolekül folgendermaßen. Aus der Reaktion der Elektronen mit dem Puffer gehen zusätzlich H-Radikale im Verhältnis 1:1 hervor. Unter der Annahme, $k_{e^- + LDH}^{1)}$ sei gleich $5 \cdot 10^{10}$ $[M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ ³⁾, wäre der mit der LDH reagierende Anteil der Elektronen gleich 14,5 % ²⁾. Der Rest wird in H-Radikale umgewandelt, so daß sich folgende Werte ergeben:

$$\begin{aligned} G(OH^\bullet) &= 2,7 \\ G(H^\bullet) &= 2,03 \\ G(e^-_{aq}) &= 1,2 \end{aligned}$$

Setzt man für $k_{e^-_{aq} + LDH}$ den Wert $1 \cdot 10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ ³⁾

ein, so erhält man $G(H^\bullet) = 2,84$ und $G(e^-_{aq}) = 0,39$.

Es bleibt demzufolge nur der $G(OH^\bullet)$ unverändert.

¹⁾ $k_{e^-_{aq} + LDH}$ ist die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion der Elektronen mit der LDH.

²⁾ Berechnung mit Hilfe der Gleichung für konkurrierende Reaktionen:

$$w_{A+B} = \frac{[B] \cdot k_{A+B}}{[B] \cdot k_{A+B} + [C] \cdot k_{A+C}}$$

B und C sind die um A konkurrierenden Reaktionspartner.

³⁾ Die Annahme für $k_{e^-_{aq} + LDH}$ wurde aus dem Vergleich verschiedener gemessener Werte für die Reaktion der Elektronen mit folgenden Substanzen abgeleitet (38):

Albumin	$1,3 \cdot 10^{10}$
Cytochrom	$1,3 \cdot 10^{11}$
Gelatine	4,9 bis $6,4 \cdot 10^{10}$ (pH 5,25 bis 6,22)
Lysozym	$7,5 \cdot 10^{10}$ (pH 6,2)
Ribonuklease	$1,0 \cdot 10^{10}$ (pH 7,0)

Die Ergebnisse wurden im Pulsradiolyseverfahren gewonnen, das als derzeit genaueste Methode für derartige Messungen gilt. Als Dimension wird Liter/Mol $\cdot$ sec angegeben.

Unter den Bedingungen der N_2O -Sättigung werden nach Gleichung IV aus den solvatisierten Elektronen $OH^\bullet$ -Radikale gebildet, wodurch sich der $G(OH^\bullet)$ -Wert auf 5,35 erhöht. Der $G(H^\bullet)$ -Wert beträgt dann 0,58. Diese durch Messung an einer bestrahlten wässrigen Lösung gewonnenen Werte dürfen jedoch auf eine 0,1 M Phosphatpufferlösung übertragen werden, da sich die $OH^\bullet$ -Ausbeute, wie oben gezeigt, dadurch nicht verändert. Gleiches gilt auch für den $H^\bullet$ -Wert, da die Elektronen wegen der hohen Geschwindigkeitskonstanten vollständig in der Reaktion mit dem N_2O verbraucht werden

$(k_{e^-_{aq}} + N_2O \cong 10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}])$ und daher mit dem Puffer nicht mehr reagieren können $(k_{e^-_{aq}} + PO_4 = 10^6 [M^{-1} \cdot sec^{-1}])$. Über diese Vorgänge wird auch in Abschnitt 3.1.2 berichtet.

Nach Stein läßt sich der Beitrag der Radikale an der Inaktivierung wie folgt darstellen:

$$(VIII): G(inact.) = g(OH^\bullet) \cdot f(OH^\bullet) + g(H^\bullet) \cdot f(H^\bullet) + g(e^-_{aq}) \cdot f(e^-_{aq})$$

$g(OH^\bullet)$ ist dabei die jeweilige Ausbeute (yield) an $OH^\bullet$ -Radikalen pro 100 eV, die zur Reaktion mit dem Enzym zur Verfügung steht ("g" wird hier zur Unterscheidung von $G(inact.)$ klein geschrieben), $f(OH^\bullet)$ die sogenannte fractional efficiency der $OH^\bullet$ -Radikale, d.h. derjenige Teil der inaktivierenden Wirkung, der durch $OH^\bullet$ -Radikale bedingt ist. Analoges gilt für die übrigen Parameter $H^\bullet$ und e^-_{aq} .

Setzt man in Gleichung VIII diejenigen g -Werte ein, die sich aus der Annahme, $k_{e^-_{aq} + LDH}$ sei gleich $10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ (was wir im übrigen für wahrscheinlicher halten), ergeben, und für G (inact.) zum besseren Vergleich 0,064 (unter N_2O) und 0,041 (unter N_2 ; siehe Tabelle 5 oben), so erhält man folgendes Gleichungspaar:

$$(A) \quad N_2: \quad 0,041 = 2,7 \cdot f(OH^\bullet) + 2,84 \cdot f(H^\bullet) + 0,39 \cdot f(e^-_{aq}) \quad ^1)$$

$$(B) \quad N_2O: \quad 0,064 = 5,35 \cdot f(OH^\bullet) + 0,58 \cdot f(H^\bullet) + 0 \cdot f(e^-_{aq}) \quad ^2)$$

Nimmt man weiter an, daß die fractional efficiency der solvatisierten Elektronen auch für LDH gleich Null sei ²⁾, so errechnet sich für $f(OH^\bullet)$ der Wert 0,0116, für $f(H^\bullet)$ dagegen nur 0,0034. Danach wären die OH -Radikale für die Inaktivierung 3 1/2 mal so wirksam wie die H -Radikale. Weiter ist zu erkennen, daß die Ausbeute der H -Radikale unter N_2O nur 25 % des Wertes unter N_2 erreicht, so daß, wie oben erwähnt, die Änderung des pH-Wertes für eine Vergrößerung der $H^\bullet$ -Ausbeute umgangen werden kann.

¹⁾ Für $k_{e^-_{aq} + LDH} = 5 \cdot 10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ erhält man $g(H^\bullet) = 2,03$ und $g(e^-_{aq}) = 1,2$.

Die Proportionen zwischen Gleichung A und B werden dadurch jedoch nicht wesentlich beeinträchtigt.

²⁾ LDH besitzt keine Disulfidbrücken, an denen das e^-_{aq} bevorzugt angreift (wie z.B. bei RNase, ohne nach Auffassung verschiedener Autoren selbst dort zu einem nennenswerten Inaktivierungseffekt zu führen).

c (mg/ml)	D ₃₇ (krd)	G - Wert (Inaktivierung)	Puffer / pH	Gas	Quelle
1,0	71,4	0,064	0,1 M Phosphat/ 7,0	N ₂ O	eigene Arbeit
1,0	106	0,041	0,1 M Ph / 7,0	N ₂	33
1,0	82	0,053	0,067 M Ph / 7,1	N ₂	4
2,0	139	0,063	0,067 M Ph / 7,1	N ₂	4
2,0	140	0,062	0,01 M Ph 1 M NaCl / 7,2	N ₂	3
3,1	280	0,048	0,1 M Ph / 7,0	N ₂	14
3,5	244	0,062	0,067 M Ph / 7,1	N ₂	4

Tab. 5: Zusammenstellung von G-Wert und D₃₇ unter den Bedingungen verschiedener Untersuchungen.

Fängt man übrigens die OH-Radikale mit t-Butanol ab und läßt dadurch allein die H-Radikale reagieren, so resultiert nach Adams (21) nur ein Anteil von 10 % der inaktivierenden Wirksamkeit durch die Reaktion der H-Radikale.

Unter der Annahme, $k_{e^-_{aq} + LDH}$ sei gleich $5 \cdot 10^{10} [M^{-1} \cdot s^{-1}]$, erhält man das Gleichungspaar:

$$(A) N_2: \quad 0,041 = 2,7 \cdot f(OH^\bullet) + 2,03 \cdot f(H^\bullet) + 0,38 \cdot f(e^-_{aq})$$

$$(B) N_2O: \quad 0,064 = 5,35 \cdot f(OH^\bullet) + 0,58 \cdot f(H^\bullet)$$

Die daraus berechneten Werte für $f(OH^\bullet) = 0,0114$ und $f(H^\bullet) = 0,0050$ weichen nur geringfügig von denen für $k_{e^-_{aq} + LDH} = 1 \cdot 10^{10} [M^{-1} \cdot sec^{-1}]$ ab (siehe oben), wobei jedoch stets $f(e^-_{aq}) = 0$ sei.

Zusammenfassend läßt sich folgendes herausstellen: Mit Hilfe von N_2O ist es möglich, nicht nur die Ausbeute an OH-Radikalen zu erhöhen und dadurch hauptsächlich deren Wirkungen am Enzym zu studieren, sondern auch gleichzeitig den Anteil der H-Radikale ohne pH-Änderung beträchtlich zu senken und den der solvatisierten Elektronen praktisch zu eliminieren. Da eine höhere Konzentration an H_3O^+ zwar die $H^\bullet$ -Ausbeute steigert, andererseits aber auch durch Beeinträchtigung der Konformation die Enzymaktivität negativ beeinflussen und so die Ergebnisse in saurem Medium im Sinne einer höheren Effektivität von $H^\bullet$ ($= f(H^\bullet)$) verfälschen kann, scheint dem OH-Radikal

aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die größere Bedeutung für die Inaktivierung zuzukommen als dem H-Radikal. Was die Rolle der solvatisierten Elektronen dabei betrifft, müssen dahingehende Untersuchungen abgewartet werden. Es läßt sich aber vermuten, daß ihr Inaktivierungsbeitrag vergleichsweise gering zu Buche schlagen dürfte.

Die Gelfiltration unter N_2O bestrahlter LDH (siehe Abschnitt 3.2) konnte die allgemeine Beobachtung bestätigen, daß die OH-Radikale bevorzugt die Bildung von Proteinaggregaten bewirken. Die Untersuchung an Proben mit abnehmender Restaktivität ließ bei einer Enzymkonzentration von 1 mg/ml eine starke Vermehrung des aggregierten Anteils bei Dosen von 90 bis 100 krd erkennen, während bis zu etwa 70 krd keine Anzeichen einer Molekülvergrößerung sichtbar waren. Dosen über 100 krd bergen bei der untersuchten Enzymkonzentration (1 mg/ml) die Gefahr der Ausfällung des Proteins, die eine Gelfiltration beeinträchtigt oder sogar verhindert.

Bestrahlt man LDH in einer N_2 -Atmosphäre, so sind infolge der geringeren OH-Radikalausbeute wesentlich höhere Strahlendosen zur Bildung von Aggregat notwendig (vgl. Abb. 14). Ist das Enzym dann aber aggregiert, hat es den größten Teil an enzymatischer Aktivität eingebüßt (14). Diese ist im N_2O -induzierten Aggregat dagegen weit stärker erhalten (vgl. Abb. 16). Übereinstimmend mit diesem Befund wird bei Peroxidase ein Anwachsen des strahlenbedingten Aggregates unter N_2O bei kleineren Dosen als unter Ar gefunden, wobei sich die verbleibende Aktivität zugunsten eines höheren Anteils im Aggregat

unter N_2O verteilt (20). Auch an RNase wird der aggregatfördernde Effekt der OH-Radikale klar nachgewiesen.

Nach Adelstein (12) wird nach Bestrahlung von RNase in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 100 krd unter N_2O bei pH 7,5 über Sephadex G-75 fast nur Aggregat eluiert, während nach Abfangen der OH-Radikale mit t-Butanol der größere Teil der Probe zweigipflig als "natives" und teilentfaltetes Enzym, der aggregierte Anteil jedoch quantitativ stark reduziert im Eluat erscheint.

Somit ist kaum zu bezweifeln, daß dem OH-Radikal neben seiner inaktivierenden Wirkung an verschiedenen Enzymen die Eigenschaft eines Aggregatbildners zugeschrieben werden muß. Adelstein (12) erklärt die Entstehung des Aggregates mit dem peripheren Angriff des OH-Radikals am Enzymmolekül. Nach Lichtin et al. (54) reagieren etwa 20 % der OH-Radikale mit Peptidbindungen unter Bildung von $C\alpha$ -Radikalen, die unter Disproportionierung und anschließender milder Hydrolyse zum Bruch der Peptidkette führen können. Niemczyk (14) konnte weiter zeigen, daß das Aggregat aus Fragmenten besteht, die kleiner als eine Untereinheit der LDH sind und über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Ob diese Bedingungen auch unter N_2O erfüllt werden, bedarf der Untersuchung in einer speziellen Arbeit.

Die Wahrscheinlichkeit struktureller Veränderungen durch Bestrahlung unter N_2O wurde auch durch Aufnahme von UV-Spektren bestätigt. Der wesent-

lichste Unterschied zu Bestrahlungen unter N_2 besteht dabei in dem relativ geringeren Dosisaufwand, der unter N_2O zu ähnlichen Kurvenverläufen führte (Abb. 17 und 18). Die bei 280 nm unter N_2 gemessene Extinktionsverminderung (3) ließ sich unter N_2O infolge verstärkter Aggregatbildung nicht darstellen.

Dagegen weist Kurve C (97 krd unter N_2O) in Abb. 18 eine im Bereich um 280 nm sich stark verändernde Extinktionsdifferenz auf, die bei genau 280 nm ein Minimum besitzt. Dieses unter N_2O deutlicher als unter N_2 ausgeprägte Verhalten könnte, wie bereits angedeutet, Ausdruck dafür sein, daß die chromophoren Aminosäurereste durch die OH-Radikale weniger stark verändert werden als aus G-Wert und "fractional efficiency" zu schließen wäre.

Tatsächlich wird unter N_2O nur Tryptophan vermehrt gegenüber N_2 -Bestrahlung abgebaut (39), während sich in beiden Gasatmosphären ein gleichförmiger, etwa gleich starker, aber nur relativ mäßiger Verlust der übrigen Aminosäuren beobachten läßt (35, 39). Deren Zerstörung, die einer Veränderung der Primärstruktur entspricht, kann also nicht allein für die Entstehung der Spektren bzw. die Inaktivierung und Aggregation der LDH verantwortlich sein. Daß der verstärkte Abbau einer einzigen Aminosäureart zu den beschriebenen Veränderungen führt, ist indes ebenso unwahrscheinlich.

Der gemessene "blue shift" weist lediglich auf eine Strukturveränderung in der Umgebung der aromatischen Aminosäuren hin (52). Die beiden Spektren

gemeinsame allgemeine Extinktionserhöhung ist der Vermehrung des Streulichtanteils durch Teilchenvergrößerung zuzuschreiben, was gelchromatographisch belegbar war.

Einen zusätzlichen Hinweis auf eine Molekülvergrößerung lieferte die Extinktionsmessung bei 280 nm an unterschiedlich stark bestrahlten Proben unter N_2O (vgl. Abb. 19). Dabei konnte der durch Gelchromatographie erhobene Befund einer sprunghaften Größenveränderung im Bereich zwischen 72 und 96 krd nachvollzogen und bestätigt werden.

Die weiterführende Messung des Extinktionsverhaltens (vgl. Abb. 20) bekräftigte die Vermutung, daß die Moleküle in erster Linie durch gegenseitige Anlagerung weiter an Größe zunehmen, da sich dieses Phänomen durch Verdünnen mit Puffer unterdrücken ließ. Entstehen, wie angenommen (14, 54), aus dem Protein durch Bestrahlung Peptidfragmente mit Radikaleigenschaften, so wäre vorstellbar, daß deren Zusammenlagerung zu Aggregat den Bestrahlungsvorgang überdauert und gleichzeitig mit Entweichen des N_2O aus der Probe, oder möglicherweise auch dadurch bedingt, zu den beschriebenen Nachreaktionen führt, die außerdem mit einem weiteren Aktivitätsverlust einhergehen (vgl. Abb. 21).

Die starke Verdünnung der Probe (1 : 50), die eine Verminderung der Konzentration und somit der Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier reaktionsfähiger Teilchen nach sich zieht, würde das Ausbleiben der verzögerten Aggregatbildung (vgl. Abb. 20) gut erklären können.

Zur Untersuchung der Einwirkung der OH-Radikale wurde LDH in 0,1 M Phosphatpuffer von pH 7,0 gelöst, mit N_2O gesättigt und einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt.

Zunächst wurden Proben verschiedener Enzymkonzentration (0,1 bis 1,2 mg/ml) bestrahlt und die Dosiseffektkurven sowie die D_{37} - und G-Werte gemessen. Dabei konnte die exponentielle Dosisabhängigkeit der Inaktivierung sowie die lineare Beziehung zwischen D_{37} und Enzymkonzentration gezeigt werden. Das Verhalten der G-Werte bestätigte eine weitgehende Unabhängigkeit der Radikalwirkung von der Anfangskonzentration des Enzyms. Im Vergleich mit Proben, die unter N_2 bestrahlt worden waren, zeigt sich eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit.

Weiterhin wurden Proben einer $7,14 \cdot 10^{-6}$ M LDH mit verschiedenen Dosen bestrahlt und über Sephadex G-200 aufgetrennt. Dabei konnte bis zu Aktivitätsverlusten von 65 % keine nennenswerte Größenveränderung beobachtet werden. Erst bei einer Dosis von 96 krd, der eine Restaktivität von 25 % entsprach, stellten sich erhebliche Entfaltungs- und Aggregationsvorgänge ein. Dabei wurde ein beträchtlicher Anteil der Restaktivität im Aggregat gefunden. Im Vergleich zur Radiolyse unter N_2 wurden unter N_2O bereits durch relativ niedrige Dosen Prozesse ausgelöst, die zur Inaktivierung und zu Konformationsänderungen führten.

Ebenfalls zum Vergleich mit LDH nach Bestrahlung unter N_2 wurden UV-Absorptions- und UV-Differenzspektren aufgenommen. Auch an diesen Beispielen wurde deutlich, daß unter N_2O mit weit geringerem Energieaufwand Änderungen in der Struktur auftreten können.

Schließlich konnte das Einsetzen der Teilchenvergrößerung in einer dosisabhängigen Messung der UV-Absorption bei 280 nm dargestellt werden. Die Fortführung dieser Messung nach Bestrahlung ergab, daß die weitere Extinktionszunahme mit der Zeit durch Aggregation bedingt sein dürfte. Die Aufnahme zweier Dosiseffektkurven in verschiedenen Zeitabständen erwies, daß dieser Vorgang auch zu einer zusätzlichen Inaktivierung des Enzyms führte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Fricke, H.,
Petersen, B.W.: Strahlentherapie 26,
329 - 346 (1927)
2. Buddecke, E.: "Grundriß der Biochemie",
Walter de Gruyter Verlag
(1973)
3. Denkl, C.P.: Dissertation Erlangen
(1971)
4. Kunigk, K.: Dissertation Erlangen
(1973)
5. Determan, H.: "Gelchromatographie",
Springer Verlag Berlin-
Heidelberg-New York
(1967)
6. Jaenicke, R.,
Knof, S.: European J. Biochem. 4,
157 (1968)
7. Sund, H.: "Pyridine Nucleotide
Dependent Dehydrogenase",
Springer Verlag Berlin-
Heidelberg-New York (1970)
8. Informationsschrift: "Sephadex-Gelfiltration
in Theorie und Praxis"
Pharmacia Uppsala/Schweden
(1969)

9. Warburg, O.,
Christian, W.: Biochem. Z. 286, 81
(1936)
10. Bergmeyer, H.U.: "Methoden der enzymatischen
Analyse", Bd. I, Weinheim/
Bergstraße, Verlag Chemie
(1970)
11. Sanner, T.,
Pihl, A.: Biochim. biophys. Acta 146,
298 (1967)
12. Adelstein, S.J.,
Mee, L.K. and
Stein, G.: Israel J. of Chem. 10,
1059 - 1066
(1972)
13. Dertinger, H.,
Jung, H.: "Molekulare Strahlenbiolo-
gie", Springer Verlag Ber-
lin-Heidelberg-New York
(1969)
14. Niemczyk, P.: Dissertation Erlangen
(1974)
15. Schüßler, H.: Biophys. 2, 315 - 324
(1973)
16. Weiss, J.: Nature (London), 157, 584
(1946)
17. Weiss, J.: Nature (London), 186, 751
(1960)
18. Hart, E.J.,
Boag, J.W.: J. Amer. Chem. Soc. 84,
4090 (1962)
19. Keene, J.P.: Nature (London), 197, 47
(1963)

20. Delincée, H. and Radola, B.J.: Rad. and Environm. Biophys. 11, 213 ~ 218, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1974)

21. Adams, G.F. and Willson, R.L. and Bisby, R.H. and Cundall, R.B.: Int. J. Radiat. Biol. 20, 405 - 415 (1971)

22. Balasubramanian, D. and Wetlaufer, D.B.: Proc. N.A.S. (USA) 55, 762 (1966)

23. Jung, H., Schüßler, H.: Stud. biophys. 7, 23 (1968)

24. Jung, H., Schüßler, H.: Z. Naturforschung 21 b, 224 (1966)

25. Haskill, J.S., Hunt, J.W.: Radiat. Res. 32, 827 (1967)

26. E. Horn, M.: Dissertation Erlangen (1973)

27. F. Horn, H.: J. chem. Physics 3, 60 (1935)

28. Program Library für den Hewlett-Packard Calculator

29. Frankenberg, D.: Physics in Medicine and Biology 14, 597 (1969)

30. Shapira, R.: Int. J. Radiat. Biol. 7,
537 (1963)

31. McPherson, A., Jr.: J. Mol. Biol. 51, 39
(1970)

32. Adams, M.J., J. Mol. Biol. 51, 31
McPherson, A., Jr., (1970)
Rossmann, M.G.,
Schevitz, R.W. and
Wonacott, A.J.:

33. Peuten, M.: Dissertation Erlangen
(unveröffentlicht)

34. Wetlaufer, D.B.: Adv. Prot. Chem. 17, 303
(1961)

35. Offinger, R.: Dissertation Erlangen
(unveröffentlicht)

36. Schüssler, H.: Int. J. Radiat. Biol. 27,
171 - 180 (1975)

37. Matheson, M.S., "Pulse Radiolysis",
Dorfman, L.M.: M.J.T. Press, Cambridge
(1969)

38. Tabellen für Geschwin- erstellt vom National
digkeitskonstanten: Bureau of Standards
N S R D S - N B S 43/46
(1973)

39. Metzger, W.: Dissertation Erlangen
(unveröffentlicht)

40. Badiello, R.,
Tamba, M.,
Quintiliani, M.:
Int. J. Radiat. Biol. 26,
311 - 319
(1974)
41. Lynn, K.R.:
Radiat. Res. 51, 255 - 264
(1972)
42. Brustard, T.:
Radiat. Res. 27, 456
(1966)
43. Aldrich, J. E.,
Cundall, R. B.:
Int. J. Radiat. Biol. 16,
343
(1969)
44. Slobodian, E.,
Newman, W.,
Fleischer, M. and
Rübenfeld, S.:
Biochem. biophys. Acta 111,
181
(1965)
45. Smith, T. W.,
Adelstein, S.J.:
Radiat. Res. 24, 119
(1965)
46. Schüssler, H.,
Jung, H.:
Z. Naturforschung B, 22,
614
(1967)
47. Holmes, B.E.,
Navon, G. and
Stein, G.:
Nature (London) 213, 1087
(1967)
48. Shapira, R.,
Stein, G.:
Science, N.Y., 162, 1489
(1968)
49. Land, E.J.,
Ebert, M.:
Trans. Faraday Soc. 63,
1181
(1967)

50. Chrysochoos, J.: Radiat. Res. 33, 465
(1968)
51. Roberts, P.B.: Int. J. Radiat. Biol. 24,
143 - 152
(1973)
52. Libor, S., Biochim. biophys. Acta
Elödi, P., 110, 484
Nagy, Z.: (1965)
53. Lichtin, N.N., Biochim. biophys. Acta
Ogdan, J., 276, 124
Stein, G.: (1972)
54. Weber, G. and "The Proteins", New York
Teale, F.W.J.: and London, Academic Press
(1965)

1. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
2. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
3. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。

4. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
5. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
6. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。

7. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
8. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
9. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。

10. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
11. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。
12. 凡屬我國人民，不論男女老幼，均應遵守法律，不得有違法亂紀之舉。

Lebenslauf

Am 11. September 1948 wurde ich, Theodor Zahn, Sohn von Pfarrer Alexander Zahn und seiner Ehefrau Margarete, geb. Cramer, zu Alesheim bei Weißenburg i. B. geboren. 1950 übersiedelte die Familie nach Brunn bei Heiligenstadt, wo ich von 1954 bis 1959 die Volksschule besuchte. Im September 1959 trat ich in das J.S.Bach-Gymnasium zu Windsbach bei Ansbach ein und legte dort im Sommer 1968 das Abitur ab. Im Oktober 1968 wurde ich zur Bundeswehr einberufen.

Nach Beendigung des Wehrdienstes im September 1970 begann ich das Studium der Medizin im Wintersemester 1970/71 an der Universität Erlangen. Nach zwei Semestern legte ich "Vorphysikum", nach fünf Semestern das "Physikum" daselbst ab. Am 17.8.1973 schloß ich die Ehe mit Claudia Hoffmann.

Im Januar 1974 nahm ich die Arbeit an vorliegender Dissertation auf. Im Sommer 1976 beendete ich das Studium mit dem Staatsexamen an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Erlangen, im Juli 1976

Hans Theodor Zahn

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990